



**Universidad Nacional Autónoma de México**

Facultad de Química

**Aislamiento, elucidación estructural y caracterización del efecto inhibitorio sobre la  $hPTP1B_{1-400}$  de fenalenonas de *Talaromyces* sp.**

*Tesis*

Que para obtener el título de  
**Química Farmacéutica Bióloga**

PRESENTA

**Brenda Sofía Jiménez Arreola**



Ciudad de México, 2019



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

**VOCAL:** Dr. José Luis Medina Franco

**SECRETARIO:** Dr. José Alberto Rivera Chávez

**1er. SUPLENTE:** Q.F.B. Genaro Jiménez Reyes

**2° SUPLENTE:** Dra. María del Consuelo Plata Ramos

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 2-6, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. JOSÉ ALBERTO RIVERA CHÁVEZ**

**SUSTENTANTE (S):**

---

**BRENDA SOFÍA JIMÉNEZ ARREOLA**

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación a través del programa UNAM-PAPIIT IA200818.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación a través del proyecto de infraestructura No. 295057.
- Al Departamento de Supercómputo (Miztli-UNAM) de la Dirección General de Cómputo y de Tecnología de Información y Computación (DGTIC) por la asignación de recursos computacionales para la realización de este trabajo de investigación a través del proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-374.

## Índice

<b>Lista de figuras.....</b>	<b>I</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>III</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>3</b>
2.1. Diabetes mellitus (DM).....	3
2.1.1. Definición y generalidades.....	3
2.1.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMTII).....	4
2.1.3. Cifras y estadísticas a nivel internacional de la DM.....	4
2.1.4. Cifras y estadísticas de la DM en México.....	5
2.1.5. Tratamiento para la DMTII.....	6
2.2. Cáncer.....	7
2.2.1. Definición y generalidades.....	7
2.2.2. Cifras y estadísticas a nivel internacional del cáncer.....	8
2.2.3. Cifras y estadísticas del cáncer en México.....	10
2.2.4. Tratamiento para el cáncer.....	11
2.3. Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B).....	12
2.3.1. Generalidades.....	12
2.3.2. Importancia de la PTP1B en el tratamiento de la DMTII.....	14
2.3.3. Importancia de la PTP1B en el tratamiento del cáncer.....	15
2.3.4. Inhibidores de la PTP1B.....	17
2.4. Productos naturales (PN).....	20
2.4.1. Generalidades.....	20
2.4.2. Microorganismos fúngicos como fuente de PN.....	20
2.4.3. Inhibidores de la PTP1B de origen fúngico.....	22
2.5. Género <i>Talaromyces</i> .....	25
2.5.1. Generalidades.....	25
2.5.2. Metabolitos representativos del género <i>Talaromyces</i> .....	26
2.6. Fenalenonas.....	32
2.6.1. Generalidades.....	32
<b>3. Justificación.....</b>	<b>40</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>41</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>42</b>
<b>6. Metodología.....</b>	<b>43</b>
6.1. Obtención de muestras para el aislamiento de especies fúngicas.....	43
6.2. Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos.....	44
6.3. Obtención de los extractos orgánicos.....	44
6.4. Procedimientos cromatográficos generales.....	45
6.5. Determinación de constantes espectroscópicas y espectrométricas.....	45
6.6. Expresión y purificación de la enzima <i>h</i> PTP1B <sub>1-400</sub> .....	45
6.7. Establecimiento de un método enzimático con la <i>h</i> PTP1B <sub>1-400</sub> .....	46
6.7.1. Curva patrón del <i>p</i> -NP.....	46
6.7.2. Curva de saturación por el sustrato <i>p</i> -NPP.....	46
6.7.3. Curva de inhibición del ácido ursólico ( <b>74</b> ).....	47
6.8. Ensayos de inhibición con la <i>h</i> PTP1B <sub>1-400</sub> .....	47
6.9. Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado.....	47

6.10. Fraccionamiento primario del extracto orgánico de IQ-313.....	47
6.11. Aislamiento de compuestos puros.....	48
6.11.1. Aislamiento de la duclauxina (64).....	48
6.11.2. Aislamiento de la talaromycesona B (75).....	48
6.11.3. Aislamiento de la xenoclauxina (76).....	50
6.11.4. Aislamiento de la bacillisporina G (77).....	51
6.12. Evaluación del efecto inhibitorio de los compuestos aislados.....	52
6.13. Caracterización de la inhibición enzimática de la duclauxina (64) y el ácido ursólico (74).....	52
6.14. Estudios de acoplamiento molecular.....	53
6.14.1. Validación.....	53
6.14.2. Enzima.....	53
6.14.3. Preparación de los ligandos.....	53
6.14.4. Acoplamiento molecular.....	53
<b>7. Resultados y discusión.....</b>	<b>54</b>
7.1. Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos.....	54
7.2. Obtención de los extractos orgánicos.....	55
7.3. Establecimiento de un método enzimático con la <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> .....	55
7.3.1. Curva patrón del <i>p</i> -NP.....	55
7.3.2. Curva de saturación por el sustrato <i>p</i> -NPP.....	56
7.3.3. Curva de inhibición del ácido ursólico (74).....	56
7.4. Ensayo de inhibición de la <i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub> del extracto original de IQ-313.....	57
7.5. Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado.....	58
7.6. Estudio químico del extracto seleccionado de <i>Talaromyces</i> sp.....	58
7.6.1. Aislamiento y elucidación estructural de los compuestos puros.....	59
7.7. Evaluación del efecto inhibitorio de los compuestos aislados.....	76
7.8. Estudios de cinética enzimática para determinar el tipo de inhibición de la duclauxina (64) y el ácido ursólico (74).....	78
7.9. Acoplamiento molecular.....	80
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>86</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>87</b>
<b>10. Referencias.....</b>	<b>88</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estimación de la prevalencia de la DM ajustada por edad en adultos (20 a 79 años).....	4
<b>Figura 2.</b> DM en México, prevalencia de la diabetes, del sobrepeso y la obesidad.....	5
<b>Figura 3.</b> Defunciones por DMTI y DMTII en México en 2017.....	6
<b>Figura 4.</b> Las características principales del cáncer.....	8
<b>Figura 5.</b> Proporción de la población total con cualquier forma de cáncer, medida con el porcentaje estandarizado por edad.....	9
<b>Figura 6.</b> Número total de muertes en 2017 atribuido a los diferentes tipos de cáncer.....	10
<b>Figura 7.</b> Número de casos nuevos de diferentes tipos de cáncer en 2018 en México.....	11
<b>Figura 8.</b> Mecanismo catalítico común de las PTP.....	13
<b>Figura 9.</b> Estructura 3D de la PTP1B y los motivos críticos para la reacción enzimática.....	14
<b>Figura 10.</b> El papel de PTP1B en la señalización de insulina y leptina.....	14
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de las dos facetas de la PTP1B en cáncer.....	16
<b>Figura 12.</b> Descripción general del rol de la PTP1B en diferentes enfermedades.....	17
<b>Figura 13.</b> Inhibidores destacados de PTP1B reportados anteriormente.....	19
<b>Figura 14.</b> Productos naturales aislados de hongos.....	22
<b>Figura 15.</b> Ubicación del municipio de Xochiatipan en la Huasteca Hidalguense, Hidalgo.....	43
<b>Figura 16.</b> Tierra de hormiguero de donde se colectaron las muestras.....	43
<b>Figura 17.</b> Cromatograma del extracto 01001-139-11.....	49
<b>Figura 18.</b> Cromatograma por CLAE del extracto 01002-05-4.....	50
<b>Figura 19.</b> Cromatograma del extracto 01001-139-7.....	51
<b>Figura 20.</b> Cromatograma por CLAE del extracto 01001-139-7.....	52
<b>Figura 21.</b> Microorganismos fúngicos aislados.....	54
<b>Figura 22.</b> Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos orgánicos.....	55
<b>Figura 23.</b> Curva patrón del <i>p</i> -NP.....	56
<b>Figura 24.</b> Curva de saturación por el sustrato <i>p</i> -NPP.....	56
<b>Figura 25.</b> Curva de inhibición con el ácido ursólico ( <b>74</b> ).....	57
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de inhibición sobre la PTP1B del extracto original y el control positivo ( <b>74</b> ).....	57
<b>Figura 27.</b> Microorganismo fúngico seleccionado IQ-313.....	58
<b>Figura 28.</b> Árbol filogenético del microorganismo fúngico IQ-313.....	58
<b>Figura 29.</b> CCF del extracto 01001-94-5.....	59
<b>Figura 30.</b> Espectro de masas de alta resolución por electrospray (ESI-MS) en modo positivo para la duclauxina ( <b>64</b> ).....	59
<b>Figura 31.</b> CCF de las fracciones agrupadas de 01001-149-7.....	61
<b>Figura 32.</b> Espectro de masas de alta resolución por DART de la talaromycesona B ( <b>75</b> ).....	61
<b>Figura 33.</b> Espectro de masas de alta resolución por DART de la xenoclauxina ( <b>76</b> ).....	63
<b>Figura 34.</b> Espectro de masas de alta resolución por DART de la bacillisporina G ( <b>77</b> ).....	65
<b>Figura 35.</b> Espectros de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la duclauxina ( <b>64</b> ), la talaromycesona B ( <b>75</b> ), la xenoclauxina ( <b>76</b> ) y la bacillisporina G ( <b>77</b> ).....	67
<b>Figura 36.</b> Espectros de RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la duclauxina ( <b>64</b> ), la talaromycesona B ( <b>75</b> ), la xenoclauxina ( <b>76</b> ) y la bacillisporina G ( <b>77</b> ).....	68
<b>Figura 37.</b> Correlaciones principales observadas en el espectro bidimensional HMBC de la duclauxina ( <b>64</b> ).....	70
<b>Figura 38.</b> Espectro bidimensional HSQC de la duclauxina ( <b>64</b> ).....	71
<b>Figura 39.</b> Espectro bidimensional HMBC de la duclauxina ( <b>64</b> ).....	71

<b>Figura 40.</b> Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC de la talaromycesona B ( <b>75</b> ).....	72
<b>Figura 41.</b> Espectro bidimensional HSQC de la talaromycesona B ( <b>75</b> ).....	72
<b>Figura 42.</b> Espectro bidimensional HMBC de la talaromycesona B ( <b>75</b> ).....	73
<b>Figura 43.</b> Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC de la xenoclauxina ( <b>76</b> ).....	73
<b>Figura 44.</b> Espectro bidimensional HSQC de la xenoclauxina ( <b>76</b> ).....	74
<b>Figura 45.</b> Espectro bidimensional HMBC de la xenoclauxina ( <b>76</b> ).....	74
<b>Figura 46.</b> Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC de la bacillisorina G ( <b>77</b> ).....	75
<b>Figura 47.</b> Espectro bidimensional HSQC de la bacillisorina G ( <b>77</b> ).....	75
<b>Figura 48.</b> Espectro bidimensional HMBC de la bacillisorina G ( <b>77</b> ).....	76
<b>Figura 49.</b> Curvas de concentración-respuesta de la duclauxina ( <b>64</b> ), la talaromycesona B ( <b>75</b> ), la xenoclauxina ( <b>76</b> ), la bacillisorina G ( <b>77</b> ) y el ácido ursólico ( <b>74</b> ).....	77
<b>Figura 50.</b> Cinéticas enzimáticas del ácido ursólico ( <b>74</b> ) y la duclauxina ( <b>64</b> ).....	78
<b>Figura 51.</b> Características de la inhibición no competitiva y mixta.....	79
<b>Figura 52.</b> Modelo estructural del sustrato ( <i>p</i> -NPP) en complejo con la hPTP1B <sub>1-300</sub> (PDB ID: 1SUG).....	80
<b>Figura 53.</b> Modelos estructurales de los cuatro compuestos y el control positivo en complejo con la hPTP1B <sub>1-300</sub> .....	82



## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Tipos de fármacos hipoglucemiantes y anti-hiperglucémicos.....	6
<b>Tabla 2.</b> Inhibidores de PTP1B de origen fúngico.....	23
<b>Tabla 3.</b> Resumen de las principales clasificaciones subgenéricas de especies de <i>Talaromyces</i> .....	26
<b>Tabla 4.</b> Metabolitos bioactivos representativos del género <i>Talaromyces</i> .....	27
<b>Tabla 5.</b> Fenalenonas representativas de cada subgrupo.....	33
<b>Tabla 6.</b> Obtención de extractos orgánicos de los hongos cultivados en Cheerios® y arroz.....	44
<b>Tabla 7.</b> Agrupamiento de fracciones primarias del extracto de IQ-313.....	48
<b>Tabla 8.</b> Separación del extracto 01001-94-5.....	48
<b>Tabla 9.</b> Agrupamiento de fracciones secundarias del extracto 01001-139-11 de IQ-313.....	49
<b>Tabla 10.</b> Agrupamiento de fracciones terciarias del extracto 01001-149-7.....	49
<b>Tabla 11.</b> Agrupamiento de fracciones del extracto 01002-05-4.....	50
<b>Tabla 12.</b> Agrupamiento de las fracciones secundarias del extracto 01001-139-7.....	51
<b>Tabla 13.</b> Agrupamiento de fracciones del extracto 01001-139-7.....	52
<b>Tabla 14.</b> Microorganismos aislados y código asignado.....	54
<b>Tabla 15.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz) y RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz) de la duclauxina ( <b>64</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	60
<b>Tabla 16.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz) y RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz) de la talaromycesona B ( <b>75</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	62
<b>Tabla 17.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz) y RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz) de la xenoclauxina ( <b>76</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	64
<b>Tabla 18.</b> Datos espectroscópicos de RMN- <sup>1</sup> H (700 MHz) y RMN- <sup>13</sup> C (175 MHz) de la bacillisporina G ( <b>77</b> ) en CDCl <sub>3</sub> .....	66
<b>Tabla 19.</b> Resumen resultados por análisis de <i>clusters</i> de las posiciones seleccionadas.....	81
<b>Tabla 20.</b> Resumen resultados acoplamiento molecular de los cuatro compuestos y el control positivo.....	83

## Lista de abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Abs	Absorbancia
AcOH	Ácido acético
ADT	Autodock Tools
Akt	Proteína cinasa B
Ala	Alanina
APD	Agar papa-dextrosa
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
c	Concentración
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub>	Acetona deuterada
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CPD	Caldo papa-dextrosa
CYA	Agar de extracto de levadura Czapek
d	Señal doble
Da	Dalton
DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTI	Diabetes mellitus tipo 1
DMTII	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPP-4	Proteína dipeptidil peptidasa 4
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo
EM	Espectrometría de masas
EM-ESI	Espectrometría de masas en modalidad de ionización por electrospray
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
ENT	Enfermedad no transmisible
ER	Retículo endoplásmico
ES	Complejo enzima-sustrato
FDA	<i>Food and drug administration</i>

g	Gramos
Gln	Glutamina
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
h	Horas
Hepes	Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-etanosulfónico
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
His	Histidina
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
<i>hPTP1B</i> <sub>1-300</sub>	Proteína tirosina fosfatasa 1B humana de 300 aminoácidos
<i>hPTP1B</i> <sub>1-400</sub>	Proteína tirosina fosfatasa 1B humana de 400 aminoácidos
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
Hz	Hertz
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGFIR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
Ile	Isoleucina
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
IQ-313	Aislamiento fúngico número 313
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Sustrato receptor de insulina tipo 1
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Jak2	Cinasa Janus 2
$K_i$	Constante de disociación
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
KO	<i>Knockout</i>
LB	Medio líquido Luria-Beratani
Leu	Leucina
LGA	Algoritmo genético Lamarckiano
Lys	Lisina
M	Molar
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MEA	Agar de extracto de malta
MeCN	Acetonitrilo
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
Met	Metionina
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mult.	Multiplicidad de señales
NAC	Norteamérica y el Caribe

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCI	Instituto Nacional de Cáncer
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
OMS	Organización Mundial de la Salud
p53	Proteína supresora de tumores
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Phe	Fenilalanina
PN	Productos naturales
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenil fosfato
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
Ras	Proteínas Ras
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Ser	Serina
SGLT2	Cotransportador de sodio-glucosa tipo 2
Src	Protooncogén tirosina-proteína cinasa
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
Tris	Trisaminometano
U	Unidades
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
UV	Ultravioleta
v	Volumen
Val	Valina
$V_{\text{máx}}$	Velocidad máxima
$\delta$	Desplazamiento químico
$\delta_C$	Desplazamiento químico de carbono
$\delta_H$	Desplazamiento químico de protón
$\lambda$	Longitud de onda

## 1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades no transmisibles (ENT) matan a 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen en todo el mundo. Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las muertes por ENT (17.9 millones cada año), seguidas del cáncer (9.0 millones), las enfermedades respiratorias (3.9 millones) y la diabetes (1.6 millones).

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades metabólicas crónicas degenerativas más comunes que se caracteriza por una deficiencia en la producción y/o acción de la insulina. De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes (IDF por sus siglas en inglés), en el mundo existen alrededor de 425 millones de personas con este padecimiento, y se espera que este número aumente a 642 millones para 2040 debido al aumento de la obesidad, la inactividad física, el envejecimiento y el crecimiento de la población [1]. La diabetes mellitus tipo 2 (DMTII) es la más común pues representa el 90% de todos los casos [2]. En particular, se caracteriza por ser una diabetes resistente a la insulina, por lo que el cuerpo no responde ante ésta, resultando en un incremento de las concentraciones de glucosa plasmática (hiperglucemia) [3], y a largo plazo en el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares. Por tal motivo, es imperativo el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden al tratamiento de la DMTII y la obesidad.

Por otra parte, el *National Cancer Institute* (NCI) de Estados Unidos define el cáncer como una colección de enfermedades en las que las células anormales pueden dividirse y diseminarse a tejidos cercanos. En 2017 se estimó que 9.6 millones de personas en el mundo murieron a causa de las diversas formas de cáncer. Actualmente la mayoría de las personas que padecen cáncer reciben una combinación de tratamientos, como cirugía con quimioterapia y/o radioterapia, mientras que algunos otros se someten a inmunoterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre, o terapia dirigida [4-6].

La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) tiene un papel importante dentro de la fisiopatología tanto del cáncer como de la DMTII. En el caso de cáncer aunque no se encuentra del todo claro el mecanismo, existe evidencia de que la PTP1B puede actuar tanto como promotor como supresor de tumores dependiendo el sustrato y el contexto celular. En cuanto a la DMTII y la obesidad, hay evidencia de que la PTP1B actúa como regulador negativo en las vías de señalización de la insulina y la leptina. Por los motivos expuestos, en los últimos años la búsqueda de inhibidores de esta proteína tanto de origen natural como sintético ha generado un gran interés.

Dentro de los recursos naturales, los hongos microscópicos han emergido como una fuente potencial de nuevos metabolitos con posible aplicación en el tratamiento de la diabetes y otras enfermedades, debido a su gran capacidad de sintetizar compuestos bioactivos y complejos [7]. A pesar de esto, sólo el 5% de las especies fúngicas se han descrito y menos de 10,000 han sido estudiadas en detalle desde el punto de vista químico.

Hasta la fecha se han descubierto y desarrollado más de 300 inhibidores de la PTP1B a partir de fuentes naturales, por ejemplo preaustinoide A6 (**1**), echinulina (**5**), aquastatina A (**10**), por mencionar algunos. Sin embargo, ninguno ha sido aprobado por la FDA ya que la mayoría de ellos sufren de baja selectividad y pobres propiedades farmacocinéticas. Teniendo en mente todo lo anterior, y sumado a la gran diversidad fúngica de nuestro país, el presente trabajo se enfocó en la búsqueda de agentes inhibidores de la PTP1B, un blanco farmacológico novedoso para el tratamiento de la DMTII, la obesidad y algunos tipos de cáncer, a partir del aislamiento de

microorganismos fúngicos de muestras de tierra de hormiguero obtenidas de la Huasteca Hidalguense.

Así, el estudio químico de la especie *Talaromyces* sp. (IQ-313) permitió el aislamiento de cuatro compuestos de tipo fenalenona: la duclauxina (**64**), la talaromycesona B (**75**), la xenoclauxina (**76**) y la bacillisporina G (**77**). Las estructuras de los compuestos se elucidaron utilizando diversas técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Todos los compuestos mostraron actividad inhibitoria sobre la *hPTP1B*<sub>1-400</sub>. La duclauxina ( $CI_{50} = 12.7 \pm 0.5 \mu M$ ), la xenoclauxina ( $CI_{50} = 21.8 \pm 0.6 \mu M$ ) y la bacillisporina G ( $CI_{50} = 13.5 \pm 0.7 \mu M$ ) fueron más potentes que el control positivo el ácido ursólico ( $CI_{50} = 26.6 \pm 1.8 \mu M$ ), mientras que estudios de cinética enzimática permitieron determinar que el compuesto **64** es un inhibidor mixto de dicha proteína con una constante de inhibición ( $K_i$ ) de  $11.5 \mu M$  y un valor de  $\alpha=3.3$ . Finalmente, los estudios de acoplamiento molecular permitieron proponer que los compuestos **64** y **75 - 77** se pueden unir a la proteína *hPTP1B*<sub>1-300</sub> (PDB ID: 1SUG) en un sitio distinto al catalítico, reforzando los resultados obtenidos experimentalmente. Es importante mencionar que este trabajo constituye el primer reporte de fenalenonas como inhibidores de esta enzima, proyectándolos como un esqueleto base novedoso para el desarrollo de ligantes con mayor afinidad.

## **2. Antecedentes**

### **2. 1. Diabetes Mellitus**

#### **2. 1. 1. Definición y generalidades**

La DM es un problema de salud mundial que mata e incapacita a las personas en su edad más productiva reduciendo la esperanza y calidad de vida. La diabetes es una amenaza que no respeta fronteras ni clases sociales y que cada día toma más víctimas en todo el mundo. Debido a esto, es imperativo maximizar esfuerzos tanto sociales como científicos para hacerle frente. Por un lado, debemos seguir haciendo conciencia para generar mejores hábitos alimenticios y de actividad física y, por otro lado, el que nos compete a los científicos, es necesario seguir con la búsqueda de nuevas sustancias más eficaces y con menos efectos adversos que sirvan para el tratamiento de esta enfermedad.

La DM es una de las enfermedades metabólicas crónicas más comunes que se caracteriza por una deficiencia en la producción y acción de la insulina. La DM causa alteraciones en la mayoría de los procesos metabólicos dentro del cuerpo humano, lo que ocasiona muchas complicaciones como ulceración, enfermedades cardiovasculares, nefropatía, neuropatía y retinopatía, entre otras [1].

La clasificación y el diagnóstico de la diabetes son complejos, pero hoy día está generalmente aceptado que existen principalmente tres tipos de diabetes: diabetes tipo 1 (DMTI), diabetes tipo 2 (DMTII) y diabetes gestacional (DMG).

También existen otros tipos de diabetes menos frecuentes, como la monogénica y la secundaria. La primera es el resultado de una única mutación genética en el gen autosómico dominante, y no el resultado de las contribuciones de múltiples genes y factores medioambientales, como en el caso de las DMTI y DMTII. La secundaria surge como complicación de otras enfermedades, como trastornos hormonales (enfermedad de Cushing o la acromegalia), enfermedades del páncreas (pancreatitis) o como resultado del uso de algunos medicamentos (corticosteroides) [8].

La DMTI o insulino dependiente se caracteriza por una escasa o nula secreción de insulina, por lo que depende principalmente de la terapia de reemplazo de esta hormona para sobrevivir. La DMTII o no insulino dependiente se presenta en pacientes con anomalías en la secreción de insulina y es el tipo más común de diabetes.

La insulina es la principal responsable de controlar la captación, utilización y almacenamiento de nutrientes celulares; aumenta la absorción de glucosa de la sangre, principalmente en el músculo y el tejido adiposo, en donde promueve su conversión a glucógeno y triglicéridos, respectivamente, inhibiendo al mismo tiempo su degradación. Además, en el hígado inhibe la gluconeogénesis, la glucogenólisis y la cetogénesis, y promueve la síntesis de proteínas principalmente en músculo [9].

### 2. 1. 2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMTII)

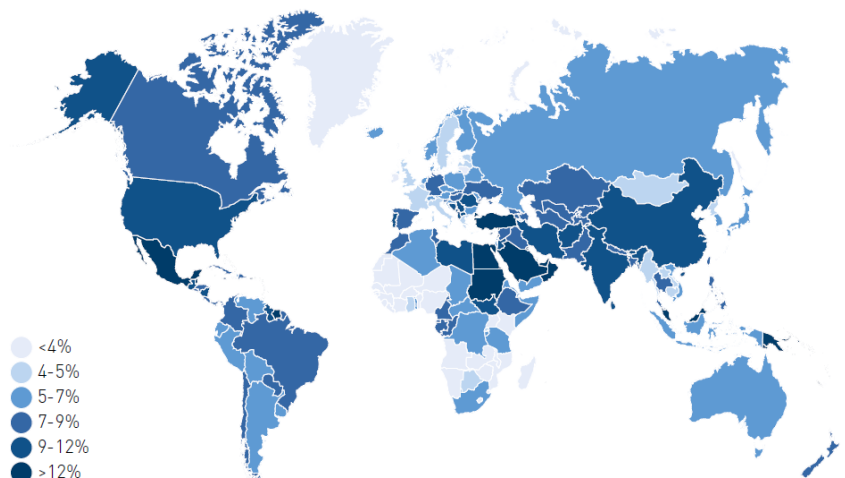
La DMTII es la más común y representa alrededor del 90% de todos los casos, y se caracteriza por presentar una resistencia a la insulina, por lo que el cuerpo no responde ante esta hormona. La insulina promueve la absorción de carbohidratos en los sitios de almacenamiento e impulsa la conversión de carbohidratos en lípidos, ya que son un medio más eficiente de almacenamiento de calorías. La interacción entre la insulina y su receptor desencadena una vía de señalización descendente que es en última instancia responsable de los efectos metabólicos de la hormona en los tejidos diana. En la resistencia a la insulina, esta vía de transducción se deteriora, lo que resulta en una acción inadecuada de esta hormona [10]. A raíz de que la insulina no funciona adecuadamente, los niveles de glucosa se elevan y se libera más insulina, fenómeno que resulta en un desgaste del páncreas y finalmente en un aumento en los niveles de glucosa en sangre [2, 11].

Para controlar la DMTII se debe tener, en primer lugar, una dieta saludable y mayor actividad física. Adicionalmente, se emplean medicamentos orales y/o la administración de insulina para ayudar a controlar los niveles de glucosa plasmática.

### 2. 1. 3. Cifras y estadísticas a nivel internacional de la DM

La DM es una de las mayores emergencias sanitarias mundiales del siglo XXI. Está entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y, junto con las otras tres principales ENT (enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades respiratorias), representa más del 80% de todas las muertes prematuras por ENT. En los países de altos ingresos, se calcula que aproximadamente entre un 87% y un 91% del total de personas con diabetes tiene DMTII, del 7% al 12% tiene DM TI y del 1% al 3% tiene otros tipos de diabetes [8].

De acuerdo con la IDF, alrededor de 425 millones de personas en todo el mundo, o el 8.8% de los adultos de 20 a 79 años, tienen DM (**Figura 1**). Alrededor del 79% vive en países de ingresos bajos y medios. El número de personas con DM alcanza los 451 millones si la edad se amplía al intervalo de 18 a 99 años. Si estas tendencias continúan, para el año 2045, 693 millones de personas de 18 a 99 años, o 629 millones de personas de 20 a 79 años, tendrán diabetes [8].





**Figura 1.** Estimación de la prevalencia de DM ajustada por edad en adultos (20 a 79 años). Tomado de [8].

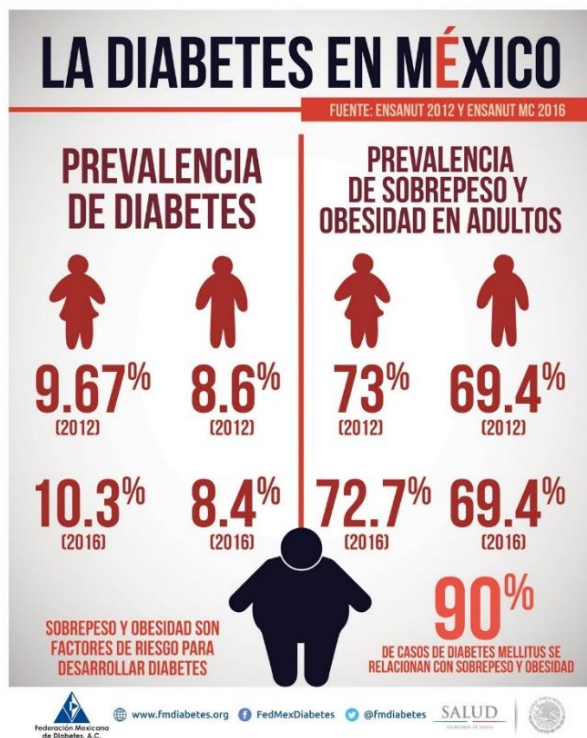
### 2. 1. 4. Cifras y estadísticas de la DM en México

Si bien el panorama de DMTII en el mundo es alarmante, en México, el panorama no es distinto, ya que en 2017 se registraron 12,030,100 casos, es decir, 14.8% de prevalencia en adultos [12]. Por otra parte, en 2016 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) [13] exploró el estado de diversas enfermedades crónicas en México, entre ellas, la DM en la población mexicana mayor de 20 años de edad. Los resultados de dicho estudio indicaron que la prevalencia de DMTII en el país pasó de 9.1% en 2012 a 9.4% en 2016, contemplando ambos sexos (**Figura 2**). Entre esta población:

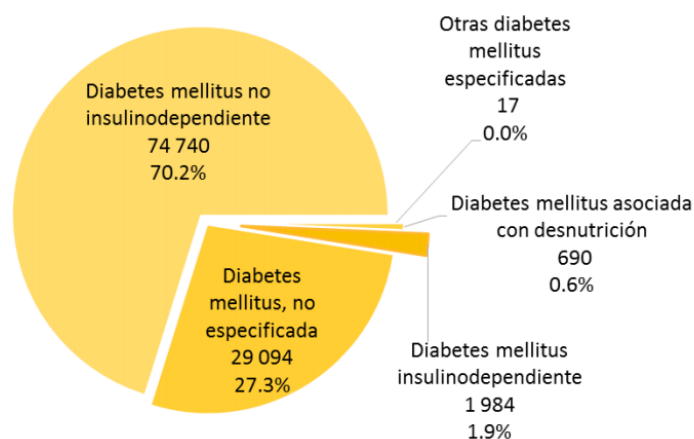
- Las mujeres reportan mayores valores de diabetes (10.3%) que los hombres (8.4%). Esta tendencia se observa tanto en localidades urbanas (10.5% en mujeres y 8.2% en hombres) como en rurales (9.5% en mujeres y 8.9% en hombres).
- La mayor prevalencia de diabetes se observa entre los hombres de 60 a 69 años (27.7%), y las mujeres de este mismo rango de edad (32.7%) y de 70 a 79 años (29.8%).

De los adultos que reportaron un diagnóstico médico previo de diabetes, se encontró lo siguiente:

- El 87.7% de los adultos con diabetes recibe un tratamiento para controlar la diabetes, cifra que aumentó ligeramente de la cifra de 85% en 2012.
- El uso de insulina como tratamiento aumentó de 6.5% en 2012 a 11.1% en 2016, así como el uso conjunto de insulina y medicación oral (6.6% en 2012 a 8.8% en 2016).
- Las complicaciones reportadas por los adultos diabéticos fueron: visión disminuida (54.5%), daño en la retina (11.2%), pérdida de la vista (9.9%) y úlceras (9.1%) en una de cada 10 personas diagnosticadas. Las amputaciones se observaron en 5.5%.



**Figura 2.** DM en México, prevalencia de diabetes, de sobrepeso y obesidad. Tomado de [14]. Cabe destacar que de acuerdo con esta encuesta, las defunciones que ocurren a causa de la DM han escalado posiciones entre las principales causas de muerte, para el periodo de 2017 ocuparon el segundo lugar a nivel nacional. En lo que respecta a las muertes por DM, se presentaron 106,525 casos en total; de ellos 1,984 casos (1.9%) correspondieron a la DMTI y 74,740 casos (70.2%) correspondieron a la DMTII, como se observa en la **Figura 3** [15].



**Figura 3.** Defunciones por DMTI y DMTII en México en 2017. Tomado de [15].

### 2. 1. 5. Tratamiento para la DMTII

A lo largo de la historia, se han utilizado diferentes remedios y fármacos para tratar la DMTII. Algunos de ellos se han incluido dentro del conjunto terapéutico de la medicina, y otros se utilizan como terapia complementaria en pacientes con hiperglucemia.

Los fármacos que se utilizan para el tratamiento de la DM actúan por diferentes mecanismos, tales como retrasar la digestión de los carbohidratos complejos (inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa), bloqueando la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), actuando directamente para influir en la resistencia a la insulina (biguanidas), reduciendo la salida de glucosa hepática mejorando la captación periférica de glucosa y estimulando la liberación de insulina (sulfonilureas). La **Tabla 1** resume los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la DM y su mecanismo de acción.

**Tabla 1.** Tipos de fármacos hipoglucemiantes y anti-hiperglucémicos. Modificado de [16].

Fármaco/Tratamiento	Nombre genérico	Mecanismo de acción
<b>DMTI</b>		
Terapia con insulina	Insulina	Estimula la fosforilación de los receptores de insulina.
Amilina	Pramlintida	Actúa para mejorar el control glucémico mediante la modulación de la tasa de vaciamiento gástrico, la prevención del aumento postprandial de los niveles

		de glucagón y el aumento de las sensaciones de saciedad.
--	--	----------------------------------------------------------

**Tabla 1.** Tipos de fármacos hipoglucemiantes y anti-hiperglucémicos. Modificado de [16] (Continuación).

Fármaco/Tratamiento	Nombre genérico	Mecanismo de acción
<b>DMTII</b>		
Sulfonilureas	Gliclazida, Glimepirida, Gliburida	Estimulan el páncreas para que produzca más insulina.
Meglitinidas	Nateglinida, Repaglinida	Estimulan el páncreas para que produzca más insulina.
Biguanidas	Metformina	Reduce la producción de glucosa por el hígado
Tiazolidinedionas (TZD)	Pioglitazona, Rosiglitazona	Incrementa la sensibilidad a insulina de las células corporales y reduce la producción de glucosa por el hígado.
Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas	Acarbosa	Disminuye la absorción de carbohidratos (azúcar) ingeridos.
Inhibidores de dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4)	Linagliptina, Saxagliptina, Sitagliptina, Alogliptina	Intensifica el efecto de hormonas intestinales (incretinas) involucradas en el control de los niveles de glucosa en sangre.
Agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)	Exenatida, Liraglutida, Dulaglutida	Mimetiza el efecto de incretinas involucradas en el control de los niveles de glucosa en sangre.
Inhibidores del transportador de sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)	Canagliflozina, Dapagliflozina, Empagliflozina	Ayuda a eliminar glucosa en la orina, disminuye la reabsorción de glucosa por los riñones.

Algunos fármacos sintéticos suelen tener efectos secundarios, entre los que destacan la hipoglucemia en dosis más altas, diarrea, acidosis láctica y problemas hepáticos. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas que permitan aumentar la calidad de vida de los pacientes con DMTII. Una alternativa con dicho propósito son las sustancias de origen natural, ya que estas pueden interaccionar con diversas dianas farmacológicas (*multitarget*) y de esta manera contribuir al tratamiento de esta enfermedad, aumentando la eficacia de los tratamientos y reduciendo los efectos adversos [1].

## 2. 2. Cáncer

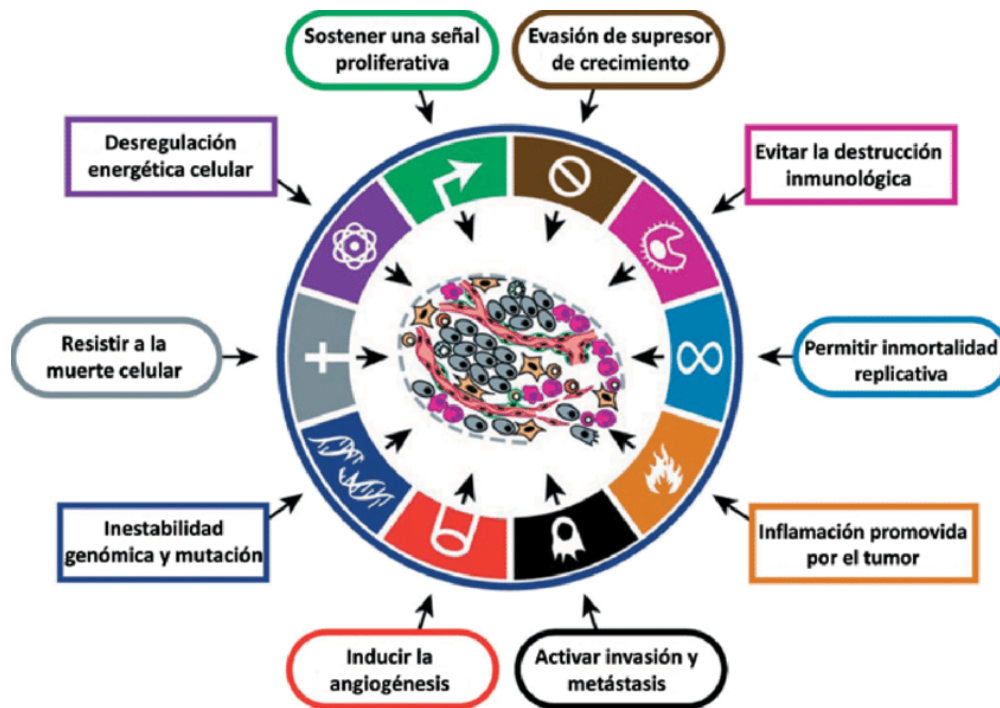
### 2. 2. 1. Definición y generalidades

El término cáncer engloba a un grupo de diferentes tipos de la enfermedad que tiene como característica principal el rápido y desordenado crecimiento de células anormales. En la mayoría de los casos se trata de padecimientos crónico degenerativos, por lo tanto, sus incidencias y tasas de mortalidad tienden a incrementarse con la edad. Asimismo, se han identificado tipos de cáncer más comunes en mujeres que en hombres y viceversa [4].

El NCI de Estados Unidos define el cáncer como una colección de enfermedades en las que las células anormales pueden dividirse y diseminarse a tejidos cercanos. Como sugiere esta definición, los diferentes tipos de cáncer pueden surgir en muchas partes del cuerpo y propagarse a otras partes de este a través de los sistemas sanguíneo y linfático.

Se estima que al menos un tercio de todos los casos de cáncer pueden prevenirse. Según la OMS, aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: tabaquismo, sobrepeso y obesidad, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física y consumo de alcohol. Sobre ellos, hay que acentuar las estrategias de prevención, aunque no son las únicas actividades preventivas que se aconseja llevar a cabo [17]. Es importante resaltar que los factores de riesgo del cáncer son prácticamente los mismos que para la DMII.

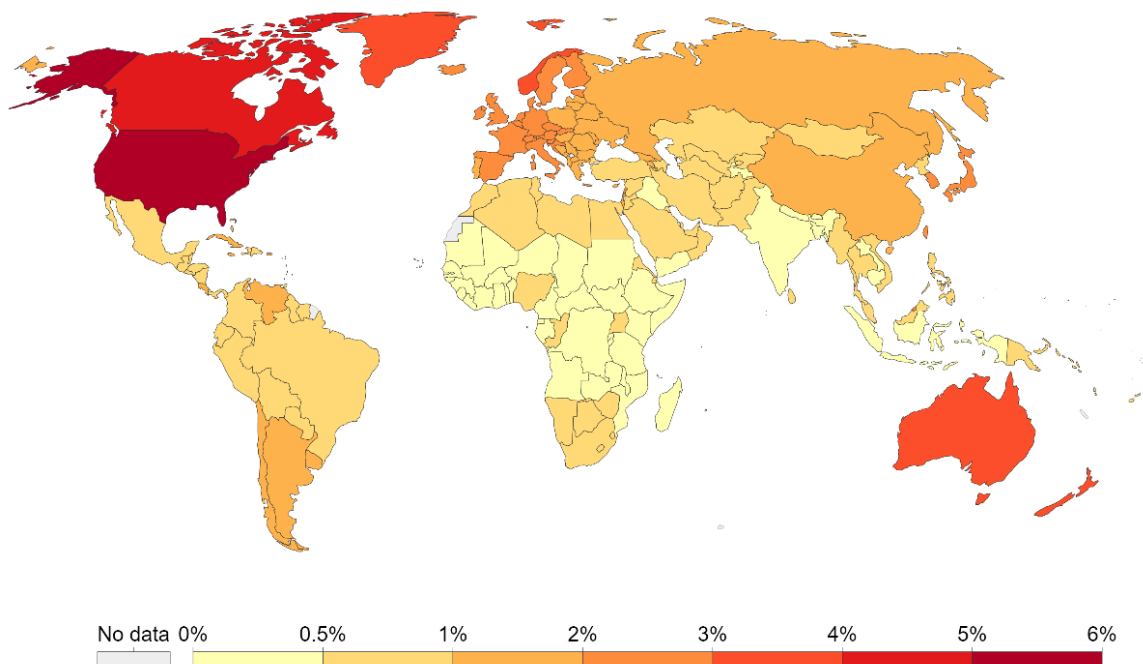
Las características distintivas del cáncer comprenden 10 capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de tumores, como se observa en la **Figura 4** [18].



**Figura 4.** Las características principales del cáncer. Modificado de [18].

### 2. 2. 2. Cifras y estadísticas a nivel internacional del cáncer

El cáncer es un problema global que desgraciadamente se ve reflejado como un tema personal para muchos, pues casi todos conocen o han perdido a alguien querido debido a este padecimiento. Cada sexta muerte en el mundo se debe al cáncer, lo que la convierte en la segunda causa principal de muerte (solo superada por las enfermedades cardiovasculares). En

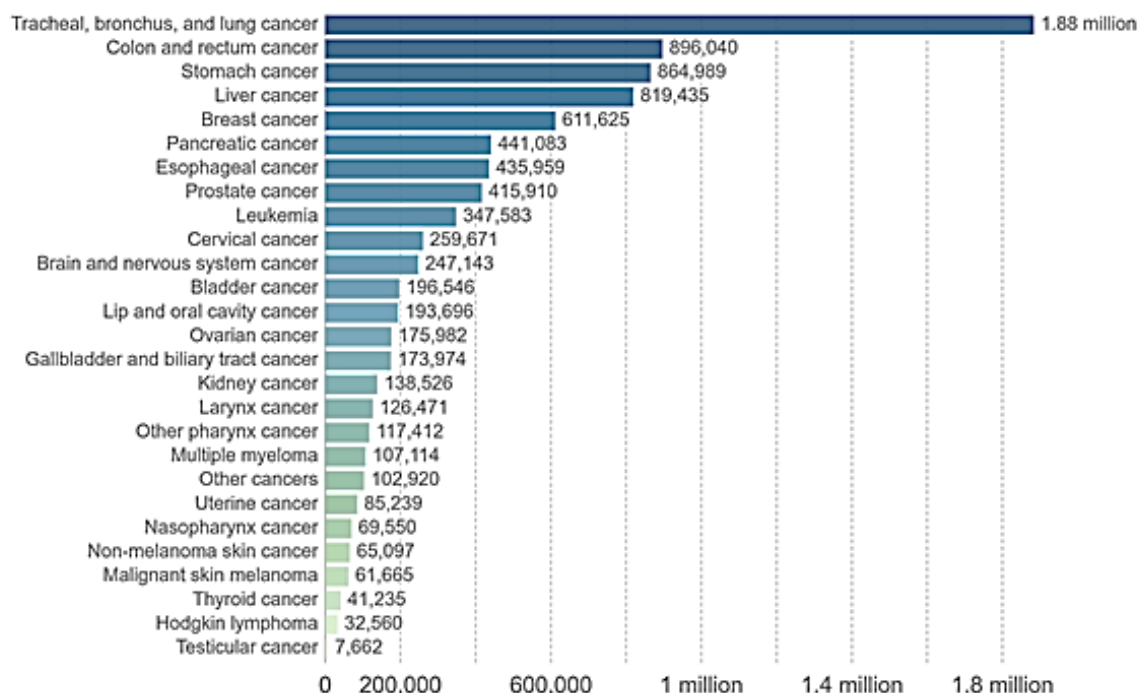


2017, se estima que 9,6 millones de personas murieron por las diversas formas de cáncer (**Figura 5**) [19].

**Figura 5.** Proporción de la población total con cualquier forma de cáncer, medida con el porcentaje estandarizado por edad. Esta proporción se estandarizó por edad asumiendo una edad constante para comparar la prevalencia entre países y a través del tiempo. Tomado de [19].

En general, existe una mayor prevalencia de cáncer en los países de mayores ingresos, lo que se atribuye en gran medida al mayor riesgo de cáncer debido a factores de estilo de vida particulares. La prevalencia del cáncer varía desde aproximadamente el 5.5% de la población hasta alrededor del 0.4%. A nivel mundial, se estima que 100 millones de personas en todo el mundo tuvieron algún tipo de cáncer en 2017. Este número se ha más que duplicado desde 1990, cuando se estima que 45 millones tenían cáncer. La prevalencia del cáncer de mama es la más alta a nivel mundial. Se estima que 17 millones de personas tuvieron cáncer de mama en 2017 y 10 millones cáncer de próstata [19].

Pero el cáncer va más allá de ser una enfermedad que deteriora la calidad de vida, pues también es una enfermedad mortal. En la **Figura 6** se observa el número de muertes por los diferentes tipos de cáncer en 2017. El cáncer de tráquea, bronquios y pulmón cobró el mayor número de vidas con 1.9 millones en un año. Le siguen el cáncer de colon y recto, estómago e hígado, todos los cuales cobraron entre 800,000 y 900,000 vidas a nivel mundial en 2017. Las muertes globales por cáncer desde 1990 hasta 2017 han aumentado alrededor de 5,7 millones [19].



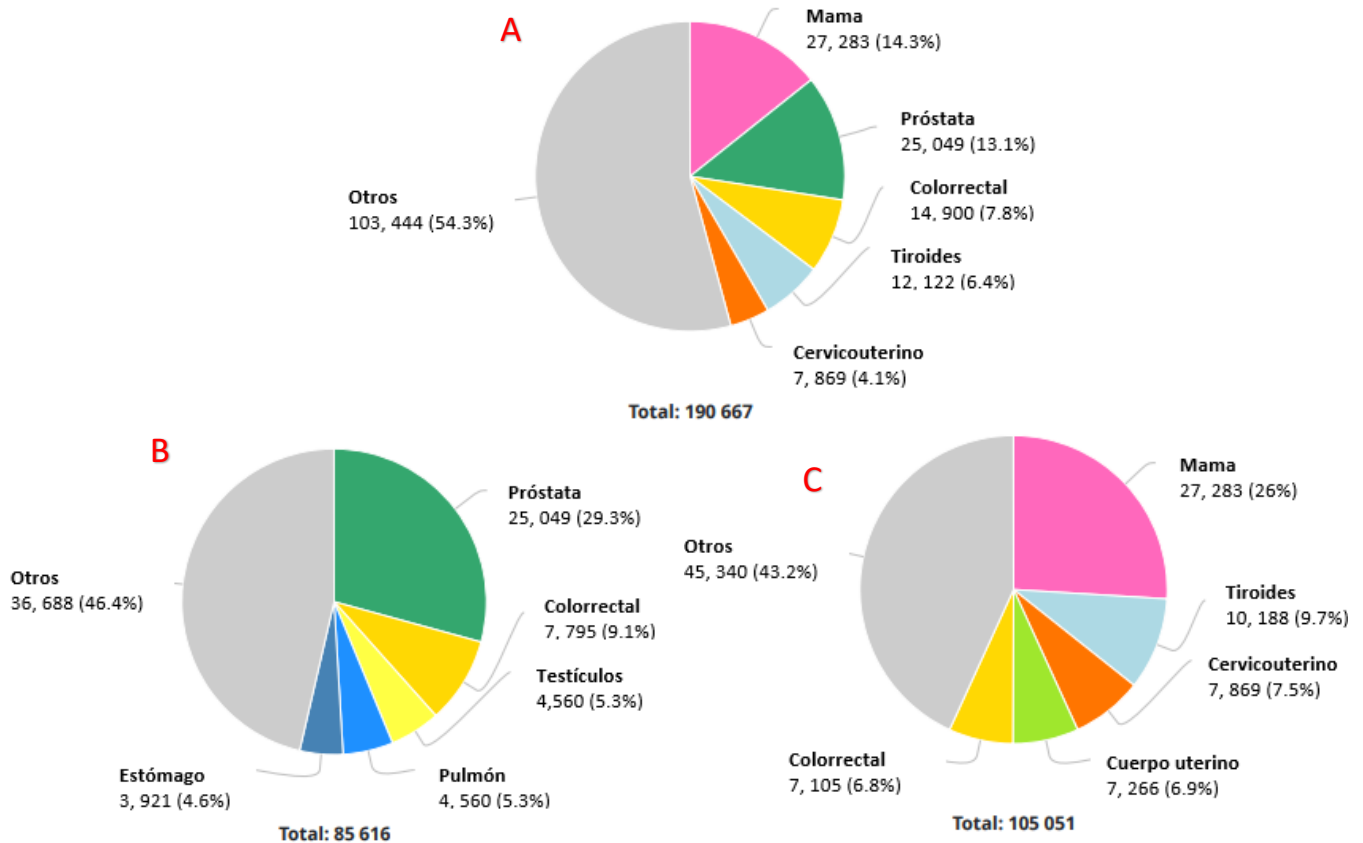
**Figura 6.** El número total de muertes en 2017 atribuido a los diferentes tipos de cáncer. Tomado de [19].

Debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, la OMS estima que para el 2030 los casos nuevos sobrepasarán los 20 millones anuales. Sin embargo, esos números podrían reducirse significativamente, ya que se calcula que entre el 30% y el 50% de los cánceres son prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, vacunación y diagnósticos y tratamientos oportunos.

### 2. 2. 3. Cifras y estadísticas del cáncer en México

La magnitud de los efectos del cáncer en la salud del país no es muy diferente al panorama mundial. El cáncer es la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la DM. Además, de acuerdo con cálculos de organismos internacionales, los cánceres de mama, de próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón son los más recurrentes en la población mexicana en ambos sexos [17].

Para los hombres, los cánceres más recurrentes son los de próstata, de pulmón, colorrectal, de hígado y gástrico; mientras que para las mujeres los más recurrentes son el de mama, cervicouterino, de hígado, colorrectal y ovario (**Figura 7**) [20].



**Figura 7.** Número de casos nuevos de diferentes tipos de cáncer en 2018 en México. A) Ambos sexos; B) Hombres; C) Mujeres. Modificado de [20].

En cuanto a las cifras de mortalidad debidas a diferentes tipos de cáncer en México, el INEGI reporta que durante el lapso de 2011 a 2016 dos de cada 100,000 habitantes de 0 a 17 años fallecen anualmente por cáncer en órganos hematopoyéticos; tres de cada 10 muertes por cáncer en la población de 30 a 59 años son consecuencia del cáncer en órganos digestivos; para la población de 60 años en adelante cuatro de cada 10 defunciones por cáncer en mujeres se deben a tumor en órganos digestivos, contra tres de cada 10 en varones, por la misma causa. Respecto al cáncer de mama, en 2016 se observan 16 defunciones por cada 100,000 mujeres de 20 años en adelante [21].

#### 2. 2. 4. Tratamiento para el cáncer

Actualmente la mayoría de las personas que padecen cáncer reciben una combinación de tratamientos, como cirugía con quimioterapia y/o radioterapia, mientras que algunos otros se someten a inmunoterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre, y/o terapia dirigida [4-6]. A continuación se describe cada tipo de tratamiento:

- Cirugía. Dependiendo del tipo de cáncer y de lo avanzado que esté, la cirugía puede usarse para extirpar todo el tumor, para reducirlo y ayudar a que otros tratamientos funcionen mejor, o para aliviar los síntomas.

- Radioterapia. Se usan altas dosis de radiación para destruir células cancerosas o reducir el tamaño de tumores mediante daño al ADN. Sin embargo, es importante mencionar que la radiación no solo destruye o hace lento el crecimiento de las células cancerosas, puede también afectar a células sanas.
- Quimioterapia. Se emplean fármacos para destruir células cancerosas. Al igual que la radioterapia, la quimioterapia no solo destruye las células cancerosas que crecen con rapidez, sino también destruye o hace lento el crecimiento de células sanas que crecen y se dividen con rapidez.
- Inmunoterapia. Busca ayudar al sistema inmunológico a combatir el cáncer con inhibidores de punto de control, transferencia adoptiva celular, anticuerpos monoclonales, citocinas, entre otros.
- Terapia dirigida. Ataca los cambios en las células cancerosas que les ayudan a crecer, a dividirse y a diseminarse.
- Terapia hormonal. Busca hacer lento o detener el crecimiento de cáncer de mama y de próstata que usan hormonas para crecer.
- Trasplantes de células madre. Son procedimientos que restauran las células madre que forman la sangre en pacientes con cáncer en quienes se destruyeron con dosis muy altas de quimioterapia o de radioterapia.

Como podemos observar, el cáncer y sus diferentes tipos son una enfermedad muy difícil de tratar, pues los tratamientos, sobre todo radio y quimioterapia generan muchos efectos adversos. Por lo tanto, las sustancias antitumorales o citotóxicas contra líneas celulares cancerosas de origen natural pueden ser alternativas atractivas en el tratamiento del cáncer debido a que se esperaría que presentaran mayor seguridad y efectividad.

## **2. 3. Proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B)**

### **2. 3. 1. Generalidades**

La fosforilación y desfosforilación de proteínas es bien conocida por modular una gran cantidad de eventos biológicos clave. Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) son enzimas que catalizan la desfosforilación de residuos de tirosina. En los seres humanos, existen más de cien PTPs que pueden funcionar como moduladores negativos o positivos en varias vías de transducción de señales [22]. Por lo anterior, se han asociado con diversos procesos de desarrollo, así como con enfermedades como el cáncer, la diabetes, la hiperlipidemia y la inflamación [23].

Todas las PTP comparten un mecanismo catalítico común basado en una cisteína nucleófila con un bajo pKa que forma un intermediario de cisteína-fosfato durante la catálisis (**Figura 8**) [24].



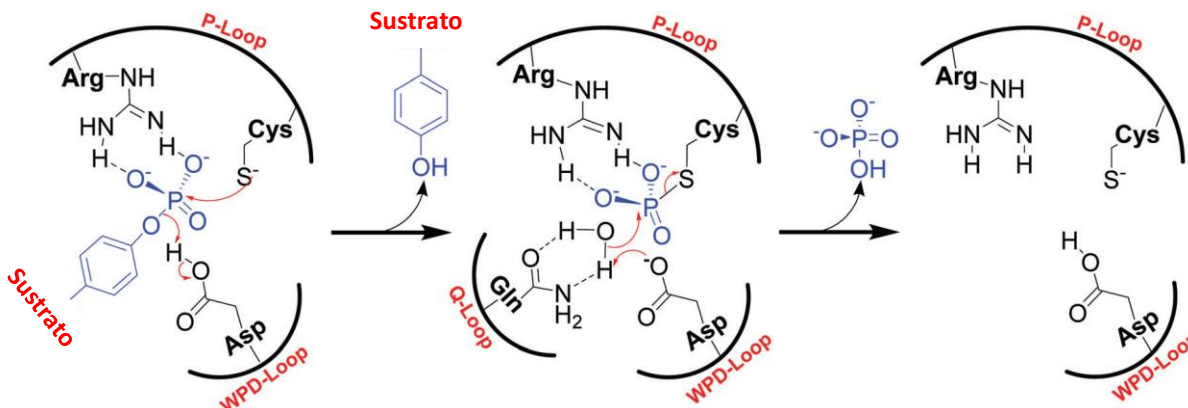
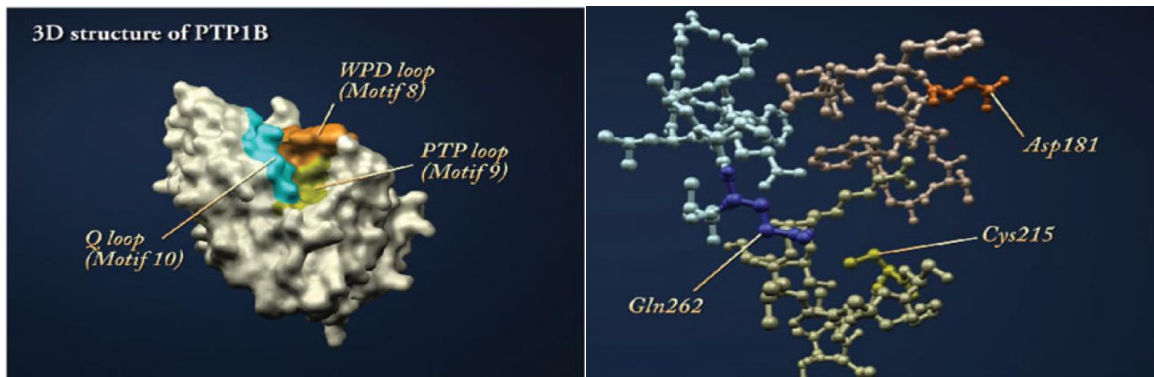


Figura 8. Mecanismo catalítico común de las PTP. Tomado de [24].

Dentro de las PTPs, la PTP1B ha cobrado un gran interés desde el punto de vista farmacológico, ya que es un blanco terapéutico emergente en los tratamientos de enfermedades crónicas degenerativas como la DMTII y el cáncer, por tan solo mencionar algunas. Estudios recientes estiman que esta proteína se originó aproximadamente hace 600 millones de años y es casi idéntica en todas las especies que se ha examinado, adicionalmente se ha documentado que cuenta con más de 30 sustratos conocidos a la fecha y se espera descubrir más [25].

La PTP1B es considerada el prototipo de la superfamilia de las PTP. Es descrita como una proteína con 435 aminoácidos de 50 kDa. Su estructura consiste en un dominio catalítico N-terminal (dominio común en la familia de PTP) seguido de dos motivos tándem ricos en prolina que permiten la interacción con proteínas con dominios que contengan SH3. La PTP1B se expresa ampliamente y se localiza en el retículo endoplásmico (ER) [23].

Como todos los miembros de la familia PTP, el dominio catalítico de la PTP1B alberga 10 motivos conservados. Los 10 motivos del dominio catalítico de la PTP1B actúan en coordinación durante el proceso catalítico. El *loop* P ó PTP contiene la cisteína catalítica que es responsable de ejecutar el ataque nucleofílico en el grupo fosfato del sustrato. El segundo paso en la reacción es llevado a cabo por el *loop* W o WPD, que es flexible y permite que el sitio activo funcione en conformación abierta o cerrada. En su conformación abierta, el motivo WPD deja accesible el sitio catalítico al sustrato y una vez que se une el sustrato el motivo WPD se cierra y acerca el residuo de aspartato para la catálisis. El último paso en la reacción involucra al *loop* Q, ahí es donde el residuo de ácido glutámico del *loop* Q y el residuo de aspartato del *loop* WPD actúan conjuntamente para hidrolizar el intermediario fosfato-cisteína con la ayuda de una molécula de agua liberando finalmente el fosfato del sitio activo (Figuras 8 y 9) [25].

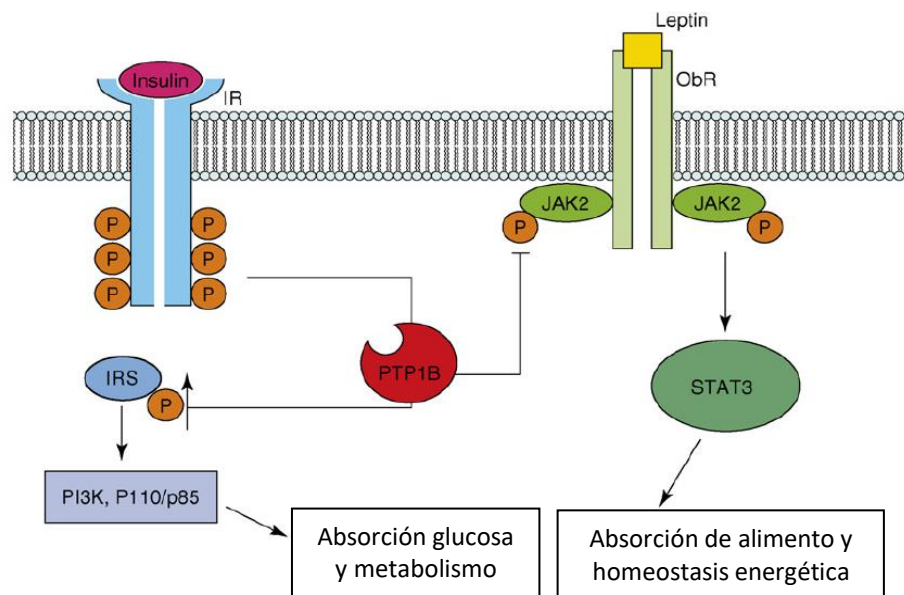


**Figura 9.** A la izquierda se ilustra la estructura 3D de la PTP1B y los motivos críticos para la reacción enzimática. A la derecha se ilustran los residuos catalíticos en la estructura secundaria. Tomado de [25].

### 2. 3. 2. Importancia de la PTP1B en el tratamiento de la DMTII

Ningún fármaco disponible actualmente es capaz de imitar la acción de la insulina fisiológica, por lo que la búsqueda de nuevos fármacos antidiabéticos eficaces y sin efectos adversos sigue siendo un desafío importante. Aquí es donde entran en escena las PTPs, en específico la PTP1B, pues como se mencionó anteriormente, la desregulación de la actividad de estas proteínas contribuye a la patogénesis de varias enfermedades humanas, incluyendo la DM.

La PTP1B es uno de los blancos más prometedores para tratar la DMTII y la obesidad debido a que muchos estudios han demostrado que esta proteína regula de forma negativa las cascadas de señalización tanto de la insulina como de la leptina. En cuanto a la primera, la PTP1B desfosforila tanto el receptor de insulina (IR) como su sustrato (IRS-1); en cuanto a la segunda, la PTP1B se une y desfosforila residuos de tirosina de la cinasa activada Janus (JAK2) en el receptor de leptina (**Figura 10**) [26].



**Figura 10.** El papel de la PTP1B en la señalización de insulina y leptina. P110/p85 es una forma específica de PI3K que responde a la señalización de insulina. Modificado de [22].

Esta proteína se localiza en la cara citoplásmica del ER y se expresa de forma ubicua incluso en los tejidos clásicos dirigidos a la insulina, como el hígado, el músculo y el tejido adiposo. La creciente evidencia de estudios bioquímicos, genéticos y farmacológicos apoyan el papel de esta enzima como regulador negativo en la señalización tanto de insulina como de leptina. [27-31]. A continuación se mencionan algunos de esos estudios y sus conclusiones:

- La sobreexpresión de la PTP1B en cultivos celulares disminuyó la fosforilación estimulada por insulina del IR y/o IRS-1, mientras que la reducción en el nivel de PTP1B, por oligonucleótidos antisentido o anticuerpos neutralizantes, aumentó la señalización iniciada por la insulina [32-35].
- La administración de inhibidores de PTP1B en ratones diabéticos normalizan la glucemia y promueven la pérdida de peso corporal en ratones obesos [36, 37]. Los ratones que carecen de PTP1B (PTP1B<sup>-/-</sup>) muestran una mayor sensibilidad a la insulina, con un aumento o prolongación de la fosforilación de tirosina del IR en músculo e hígado.
- Estudios en ratones knockout (KO) PTP1B<sup>-/-</sup> sometidos a dietas altas en grasas disminuyen los niveles de triglicéridos. La pérdida de peso asociada a la administración de inhibidores de PTP1B está directamente relacionada con el gasto de energía y a una supresión de la ingesta de alimentos, debido a una mayor sensibilidad a la hormona leptina [38-40].

En conjunto, los resultados de estos estudios, han proporcionado una sólida prueba que valida la idea de que la inhibición de la PTP1B podría abordar tanto a la diabetes como a la obesidad y hacer de esta molécula un objetivo primordial para el desarrollo de nuevos fármacos.

### 2. 3. 3. Importancia de la PTP1B en el tratamiento del cáncer

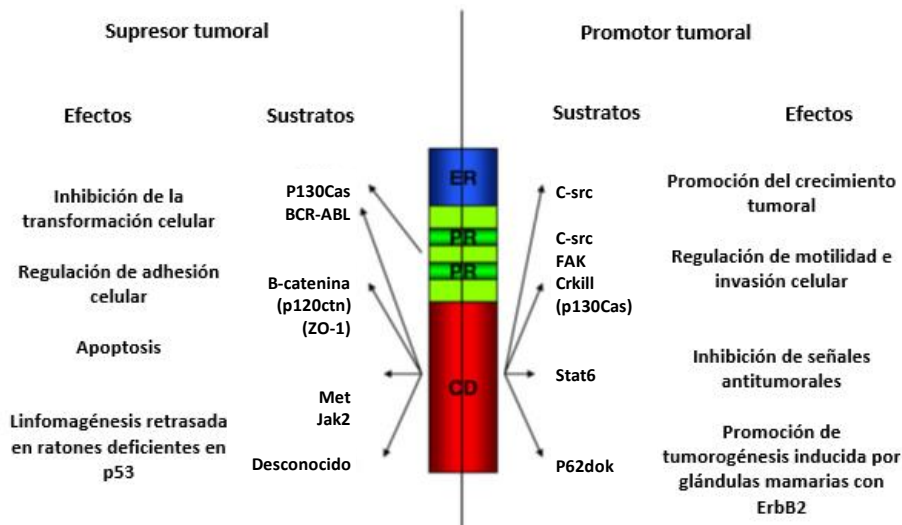
La PTP1B tiene un papel importante dentro de la fisiopatología del cáncer, aunque no se encuentra del todo clara. Existe evidencia de estudios bioquímicos, genéticos y farmacológicos de que esta proteína puede actuar tanto como promotor y como supresor de tumores dependiendo el sustrato y el contexto celular [41-53]. A continuación se señalan algunos estudios y sus conclusiones que demuestran dichas implicaciones (**Figura 11**):

- La eliminación de la PTP1B reduce el crecimiento celular e induce tanto el arresto del ciclo celular como la apoptosis; también así se reduce la migración y la invasión al revertir el proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT) [41].
- La expresión de la PTP1B está elevada en células epiteliales humanas de mama HER2-transformadas y tumores. Así, la eliminación de esta enzima o el uso de un inhibidor de PTP1B retrasa el inicio de la formación de tumores mamarios y reduce la metástasis pulmonar en el modelo de ratón MMTV Her2/NeuT al reducir la señalización de Ras/MAPK y Akt. Además, la sobreexpresión específica de tejido de PTP1B induce tumorigénesis mamaria [42].
- La expresión elevada de PTP1B promueve la proliferación celular y la metástasis en el cáncer de pulmón de células no pequeñas a través de la activación de las vías de señalización Src/Ras/ERK y PI3K/Akt [43].
- La PTP1B se encarga de regular la actividad del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1R, uno de los receptores importantes relacionado con la

transformación de células malignas, así como en la progresión de distintos tipos de tumores), desfosforilando e inactivándolo, y por lo tanto, bloqueando su señalización. Río abajo del IGF1R, existen múltiples vías que median la proliferación, transformación y supresión de apoptosis, entre ellas MAPKs y Akt. La pérdida de PTP1B puede favorecer la supervivencia celular mediada por IGF1. En células COS y en fibroblastos se ha demostrado que las células deficientes en PTP1B tienen mayor protección a la apoptosis mediada por IGF1, mayor migración y mayor eficiencia para formar colonias [44].

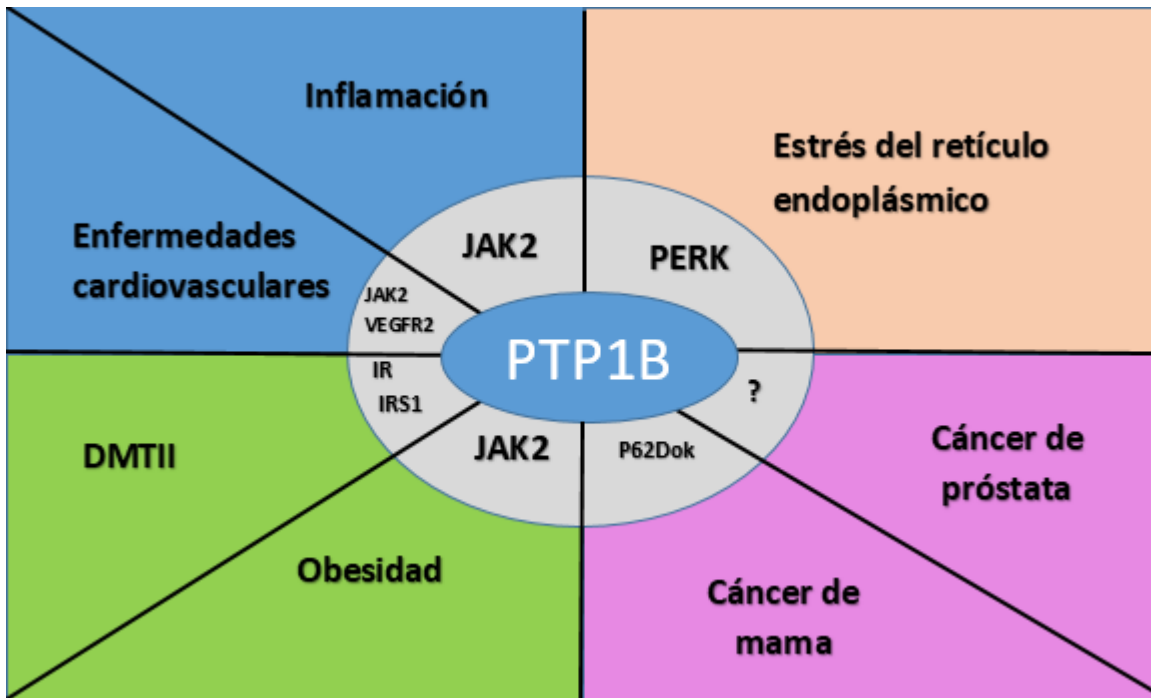
- La PTP1B tiene propiedades oncogénicas mediante la activación de Src (tirosina cinasa no receptora) que es desregulada en varios tipos de tumores [45]. El rol crucial de las cinasas Src en el desarrollo de tumores se debe a su efecto en la proliferación, supervivencia, adhesión, migración, invasión y metástasis celular. La actividad elevada de las cinasas Src ha sido reportada en distintas líneas celulares cancerígenas humanas, por ejemplo células de cáncer de mama, de pulmón, y de colon [46-49]. Diversos estudios han demostrado que la PTP1B puede actuar como un activador de las cinasa Src, incrementando la tumorigénesis y promoviendo la progresión tumoral en células de cáncer de colon [50] y células de cáncer de páncreas [51].

En resumen, todos los estudios antes mencionados indican que la PTP1B tiene un papel importante como promotor tumoral. Sin embargo, en contraste con su papel oncogénico, la PTP1B también puede funcionar como un supresor tumoral, ya que se ha demostrado que el bloqueo genético de la PTP1B acelera la linfomagénesis en ratones nulos de p53 [52].



**Figura 11.** Representación esquemática de las dos facetas de la PTP1B en cáncer. Dada su función en diferentes procesos celulares, la PTP1B puede actuar como supresor o promotor tumoral mediante la desfosforilación de sustratos específicos. ER: cola C-terminal hidrofílica anclada al retículo endoplásmico; PR: motivo rico en prolina; CD: dominio catalítico. Modificado de [53].

La **Figura 12** describe varios hallazgos clave que relacionan a la PTP1B con estados de enfermedad, junto con los sustratos conocidos actualmente. Se ha demostrado que la PTP1B desempeña un papel destacado en la señalización metabólica (especialmente la obesidad y la DMTII) a través de la interacción con el IR y JAK2 río abajo del receptor de la leptina. Además, la PTP1B a través de p62Dok y un sustrato aún por descubrir tiene propiedades promotoras tumorales tanto en cáncer de mama como de próstata. Se ha acumulado una cantidad significativa de evidencia vinculando a la PTP1B a la respuesta de estrés del retículo endoplásmico a través de la interacción con PERK, aunque el efecto de esta interacción aún se debate. La PTP1B también puede influir en la inflamación a través de la regulación de los diversos JAK y STAT, lo que sugiere un papel interesante y aún en gran parte sin descubrir en la señalización inmunológica [25].



**Figura 12.** Descripción general del rol de la PTP1B en diferentes enfermedades. Modificado de [25].

#### 2. 3. 4. Inhibidores de la PTP1B

Como se mencionó en el apartado 2.3.3, muchos estudios bioquímicos, genéticos y farmacológicos demuestran que la inhibición de la PTP1B podría ser útil en el tratamiento de la DMTII, la obesidad y algunos tipos de cáncer.

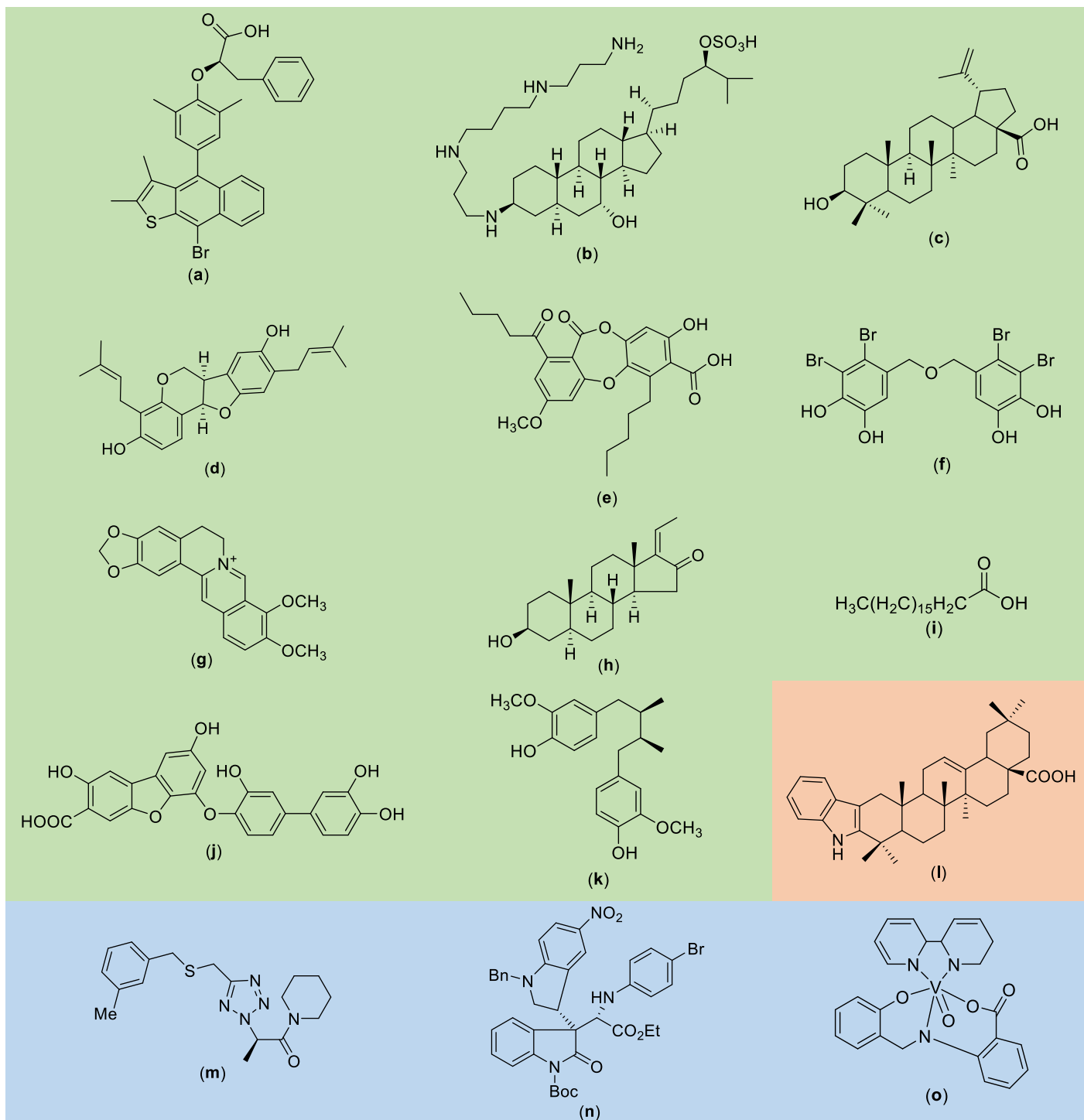
El hecho de que tanto la DMTII como la obesidad compartan factores de riesgo con el cáncer, han impulsado múltiples estudios sobre las relaciones que puedan existir entre estos padecimientos, y se ha demostrado que los pacientes con DMTII tienen mayor riesgo de neoplasias y mayor riesgo de muerte por cáncer [54]. La existencia de hiperglucemia e hiperinsulinemia, así como otros factores asociados a DMTII y obesidad, son factores de riesgo independientes para cáncer, lo que muestra una estrecha correlación entre estas enfermedades [55]. Dentro de las vías metabólicas de la DMTII y la obesidad se encuentran la vía de la leptina, el eje insulina-glucosa, y la activación cruzada del

IGF1R. La activación de IGF1R es el mecanismo más frecuentemente propuesto para explicar el incremento en la incidencia de cáncer en personas diabéticas [55-56].

Tanto la insulina como el IGF1 tienen afinidad tanto por el receptor de la insulina como por el IGF1R debido a su estructura similar aunque en diferentes proporciones. El sistema IGF1/IGF1R tiene efectos mitogénicos y antiapoptóticos, y la hiperglucemia que ocurre en los pacientes diabéticos o en los obesos resistentes a la insulina puede incrementar estos efectos a través de varios mecanismos. Así, en los pacientes con hiperinsulinemia, la insulina puede desencadenar proliferación de células malignas a través de la estimulación del sistema Akt. Además la hiperglucemia puede promover la tumorigénesis por vía directa ya que las células malignas dependen de glucólisis para obtener su energía [57].

Entonces, debido a la importancia de esta enzima en la progresión de enfermedades crónicas degenerativas, diversos grupos de investigación han sumado esfuerzos para establecer los mecanismos bioquímicos y farmacológicos modulados por esta proteína. Desde el punto de vista farmacológico dos potentes inhibidores de la PTP1B, el ertiprotafib y la trodusquemina (**Figura 13**), se han identificado e ingresado en ensayos clínicos, sin embargo, para ambos compuestos los ensayos se suspendieron en la Fase II debido a una eficacia insatisfactoria [58]. Sin duda alguna, uno de los principales desafíos en el diseño y desarrollo de inhibidores de PTP1B es la selectividad contra otras PTPs, que comparten una estrecha homología con PTP1B. Por ello, hasta la fecha ninguno de los inhibidores de la PTP1B reportados ha sido aprobado por la FDA, ya que la mayoría de ellos sufren de escasa selectividad y pobres propiedades farmacocinéticas.

Hasta la fecha, se han descubierto y desarrollado más de 300 inhibidores de PTP1B a partir de fuentes naturales como terpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos, bromofenoles, alcaloides, esteroides y lignanos entre otros, semisintéticos como derivados de ácidos grasos y sintéticos como complejos metálicos [59]. Aunque muchos inhibidores de PTP1B exhiben un potencial clínico prometedor, no hay inhibidores de PTP1B utilizados clínicamente, debido, en gran medida a su baja selectividad y/o actividad [60]. Por lo tanto, es necesario continuar buscando inhibidores que superen estas limitaciones mediante diversas estrategias, como por ejemplo buscar compuestos con baja polaridad para mejorar sus propiedades farmacocinéticas o que se unan a la PTP1B en sitios alostéricos para favorecer su selectividad.



**Figura 13.** Inhibidores destacados de PTP1B de origen natural (verde), semisintético (naranja) y sintético (azul). (a) Ertiprotafib,  $\text{Cl}_{50}$ = 1.4  $\mu\text{M}$ ; (b) Trodusquemina,  $\text{Cl}_{50}$ = 1.0  $\mu\text{M}$ ; (c) ácido betulínico,  $\text{Cl}_{50}$ = 1.5  $\mu\text{M}$ ; (d) erybraedin A,  $\text{Cl}_{50}$ = 2.4  $\mu\text{M}$ ; (e) ácido lobarico,  $\text{Cl}_{50}$ = 0.9  $\mu\text{M}$ ; (f) derivado de bromofenol,  $\text{Cl}_{50}$ = 1.5  $\mu\text{M}$ ; (g) berberina,  $\text{Cl}_{50}$ = 0.2  $\mu\text{M}$ ; (h) z-aglawone,  $\text{Cl}_{50}$ = 3.5  $\mu\text{M}$ ; (i) ácido esteárico,  $\text{Cl}_{50}$ = 2.3  $\mu\text{M}$ ; (j) derivado ácido vanílico,  $\text{Cl}_{50}$ = 1.7  $\mu\text{M}$ ; (k) ácido *meso*-dihidroguayarético,  $\text{Cl}_{50}$ = 19.6  $\mu\text{M}$ ; (l) derivado de ácido maslínico,  $\text{Cl}_{50}$ = 0.6  $\mu\text{M}$ , (m) análogo de tetrazol,  $\text{Cl}_{50}$ = 5.7 nM; (n) dímero de indól,  $\text{Cl}_{50}$ = 2.1  $\mu\text{M}$ ; (o) complejo de vanadio,  $\text{Cl}_{50}$ = 0.03  $\mu\text{M}$  [58-61].

## 2. 4. Productos naturales

### 2. 4. 1. Generalidades

Los productos naturales (PN), o metabolitos secundarios, son generalmente moléculas de señalización que permiten que el organismo no solo sobreviva, sino que prospere. Además, los PN han desempeñado un papel importante en el desarrollo de nuevos medicamentos para la salud humana, ya que alrededor del 65% de todos los fármacos aprobados en el periodo de 1981-2014 están inspirados en, son derivados de, o son directamente productos naturales [64].

A su vez, los fármacos de origen sintético aumentaron también desde 1981 y abarcaron aproximadamente la mitad de todos los medicamentos disponibles. Sin embargo, los efectos adversos, la toxicidad, la infraestructura necesaria, la adhesión a un mecanismo regulador más estricto y la experiencia en el diseño y preparación a gran escala de moléculas sintéticas y semisintéticas han ocasionado que se reanude la búsqueda constante e innovadora de prototipos estructurales de origen natural [65].

La estrategia general para el aislamiento de moléculas bioactivas a partir de fuentes naturales implica la selección de un extracto bioactivo; posteriormente, se fracciona empleando diversas técnicas cromatográficas; enseguida, se evalúa la actividad de cada fracción y se seleccionan las más apropiadas para el aislamiento de compuestos activos; finalmente, se realiza la identificación de las moléculas aisladas y se corrobora su actividad [66].

### 2. 4. 2. Microorganismos fúngicos como fuente de PN

Los metabolitos secundarios de hongos o PN fúngicos tienen una contribución cada vez más importante en los sectores farmacéuticos, agrícolas e industriales (**Figura 14**).

Entre los PN de origen fúngico se encuentran las estatinas que reducen el colesterol (ej. lovastatina), antibióticos comunes (ej. penicilina y cefalosporina), insecticidas (ej. ácidos nodulispóricos) y pigmentos (ej. carotenoides) [67]. Los PN fúngicos son frecuentemente bioactivos y químicamente diversos debido a su función de conferir una ventaja selectiva al hongo productor en entornos competitivos [68]. A pesar de esto, de los aproximadamente 5 millones de especies de hongos, sólo el 5% de ellos se han descrito y menos de 10,000 han sido estudiados en detalle desde el punto de vista químico [7, 68, 69].

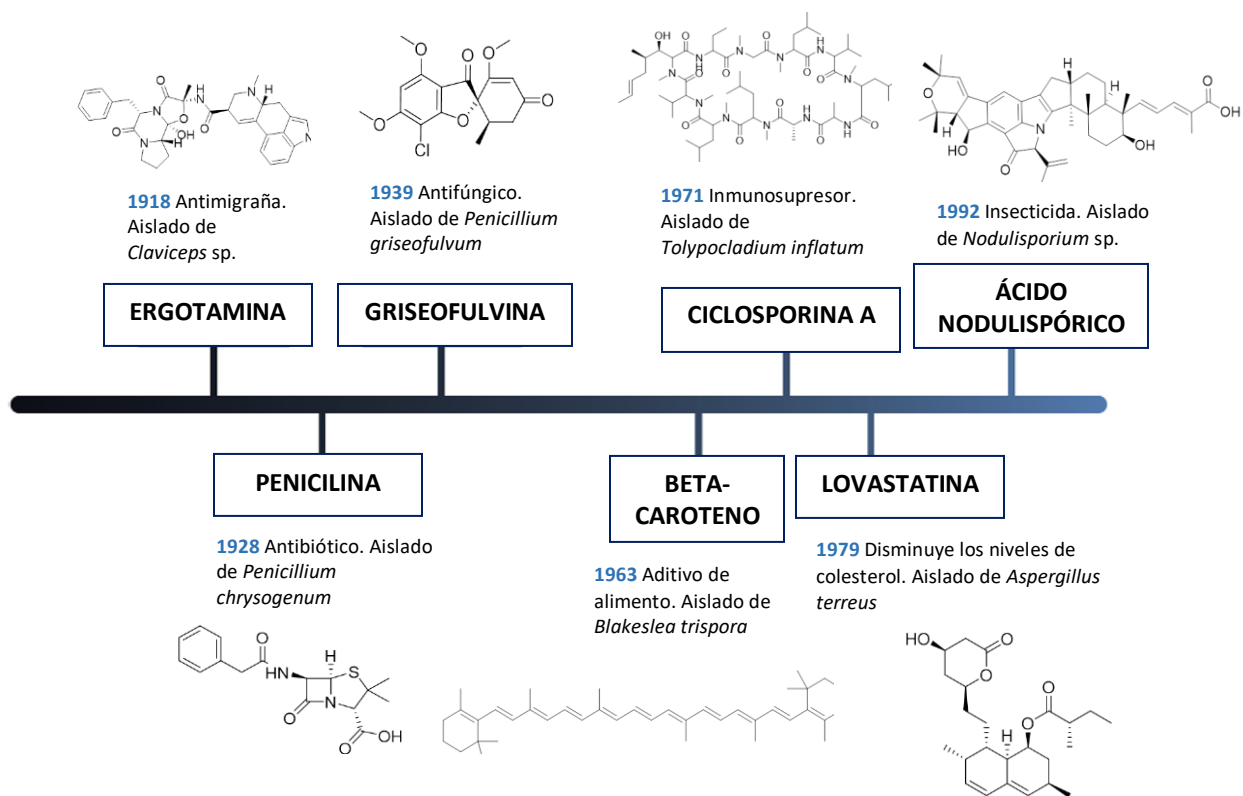
Los PN fúngicos se clasifican generalmente en cinco categorías según su origen biosintético: policétidos, péptidos no ribosomales, terpenoides, alcaloides y compuestos de biogénesis mixta. A partir de estas categorías, los PN se diversifican en una amplia gama de cadenas de carbono que potencialmente contienen anillos heterocíclicos y varios estéreocentros [70-72]. De las diferentes clases, los policétidos representan la mayoría de los productos naturales de hongos [72].

Estudios recientes han demostrado que los productos naturales fúngicos son candidatos prometedores para expandir el espacio químico medicinal. Dichos estudios se realizaron mediante la comparación de la complejidad molecular de más de 200 metabolitos fúngicos con medicamentos anticancerígenos y no anticancerígenos aprobados por la FDA, compuestos en estudios clínicos, compuestos de *screening* general y moléculas Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS).



Los resultados fueron cuantificados empleando varias huellas digitales moleculares y propiedades fisicoquímicas. Los resultados obtenidos en dicho estudio indicaron que:

- El perfil de la complejidad estereoquímica y el carácter 3D (estructuras no planas) de los metabolitos fúngicos indican que estos tienen estructuras químicas más complejas que los medicamentos aprobados por la FDA, los compuestos que se someten a ensayos clínicos y las moléculas de *screening* en general, lo que hace que los metabolitos secundarios fúngicos sean compuestos atractivos como fuentes de fármacos con el potencial de tener alta selectividad y menor toxicidad [73].
- Los valores del área de superficie polar topológica (TPSA, parámetro importante para medir la permeabilidad, solubilidad y transporte de compuestos) de los metabolitos fúngicos son comparables a los de los medicamentos oncogénicos aprobados por la FDA [73].
- Los productos naturales fúngicos en general tienen algunas ventajas importantes sobre los compuestos sintéticos. Su biosíntesis implica interacciones repetitivas con enzimas y para la mayoría de ellos su función biológica real probablemente depende de la capacidad de unirse a ellas. Lo que sugiere que los metabolitos secundarios exhiben características de unión avanzadas en comparación con los compuestos sintéticos [73].
- Los metabolitos fúngicos son una fuente atractiva de moléculas líderes porque combinan una alta complejidad y diversidad estructural con propiedades fisicoquímicas similares a los medicamentos [73].
- Los productos naturales fúngicos son sistemas cíclicos con pocas ramificaciones y presentan mayor diversidad que los compuestos de bibliotecas comerciales [74].
- Los metabolitos fúngicos contienen una gran proporción de *scaffolds* únicos y diferentes que no se encuentran en otros conjuntos de compuestos. Por lo tanto, se pueden considerar como fuente prometedora de compuestos candidatos para el desarrollo de fármacos [74].



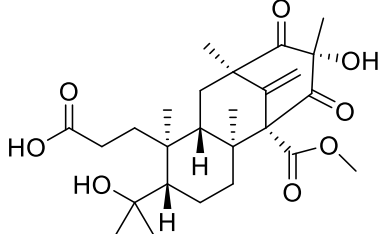
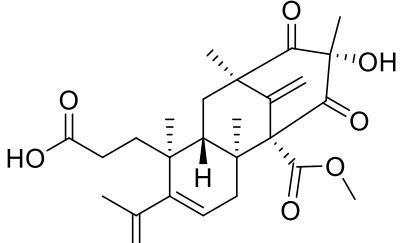
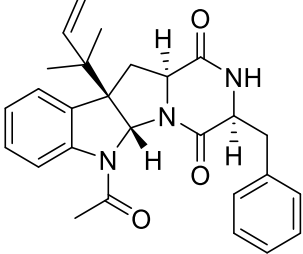
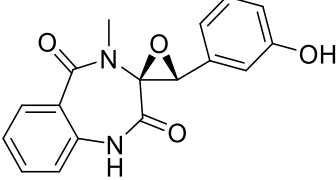
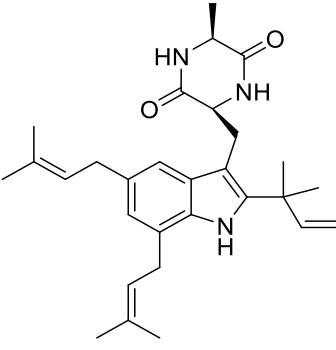
**Figura 14.** Productos naturales aislados de hongos. Se presentan ejemplos de moléculas junto con su año de aislamiento y función. Modificado de [67].

### 2. 4. 3. Inhibidores de PTP1B de origen fúngico

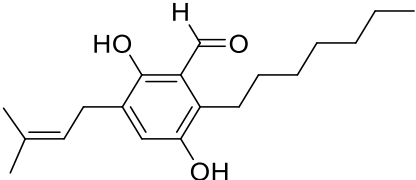
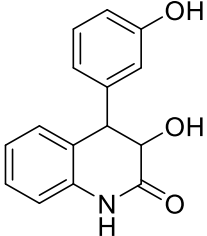
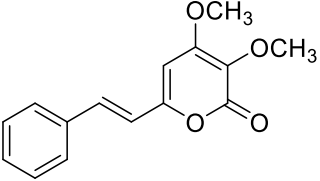
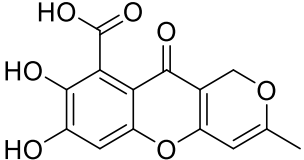
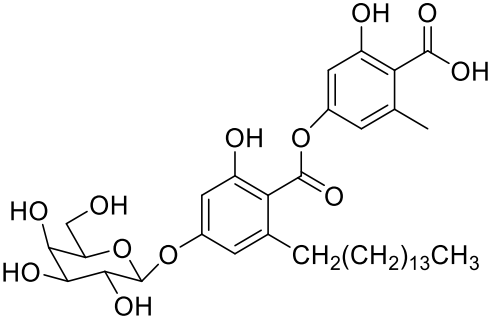
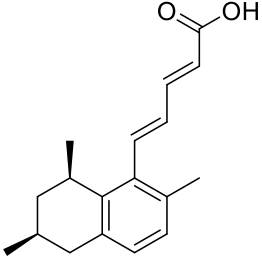
A la fecha se han reportado diferentes compuestos aislados de microorganismos fúngicos que presentan actividad inhibitoria sobre la enzima PTP1B (**Tabla 2**). Esto refuerza la idea de que los hongos son una fuente de metabolitos con potencial contra la DMTII, la obesidad y algunos tipos de cáncer aunado a la gran biodiversidad fúngica en México.

Es importante mencionar que resulta imposible discernir si los inhibidores de origen fúngico son más selectivos y/o potentes que los inhibidores de otras fuentes naturales o de origen sintético debido a que en los tres grupos hay una gran diversidad tanto estructural como de actividad inhibitoria sobre la PTP1B. Sería pertinente realizar estudios quimioinformáticos para establecer las diferencias de selectividad y potencia entre los tres grupos de inhibidores.

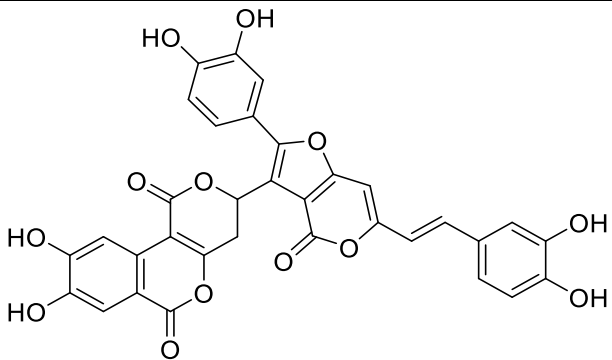
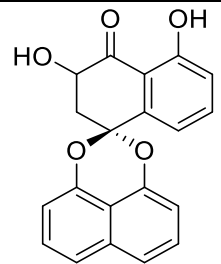
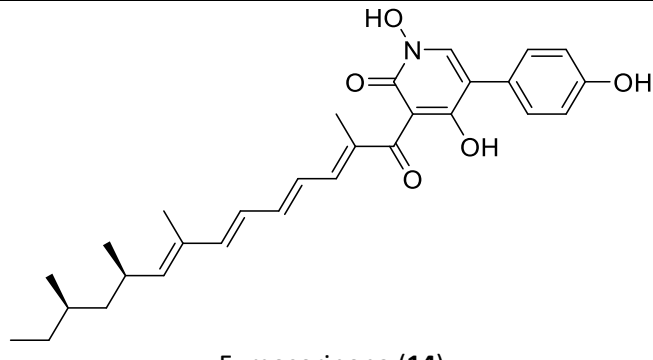
**Tabla 2.** Inhibidores de PTP1B de origen fúngico.

Metabolito	Fuente de obtención	CI <sub>50</sub> /Referencia
 <p>Preaustinoide A6 (1)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. SF-5497</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 17.6 μM [63]</p>
 <p>Berkeleiona C (2)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. SF-5497</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 58.4 μM [63]</p>
 <p>Fructigenina A (3)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. y <i>Eurotium</i> sp.</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 10.7 μM [75]</p>
 <p>Ciclopenol (4)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. y <i>Eurotium</i> sp.</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 30.0 μM [75]</p>
 <p>Echinulina (5)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. y <i>Eurotium</i> sp.</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 29.4 μM [75]</p>

**Tabla 2.** Inhibidores de PTP1B de origen fúngico (continuación).

Metabolito	Fuente de obtención	CI <sub>50</sub> /Referencia
 <p>Flavoglaucina (6)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. y <i>Eurotium</i> sp.</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 13.4 μM [26, 75]</p>
 <p>Viridicatol (7)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. y <i>Eurotium</i> sp.</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 64.0 μM [26, 75]</p>
 <p>Penstirilpirona (8)</p>	<p><i>Penicillium</i> JF-55</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 5.3 μM [76]</p>
 <p>Ácido anhidrofulvico (9)</p>	<p><i>Penicillium</i> JF-55</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 1.9 μM [76]</p>
 <p>Aquastatina A (10)</p>	<p><i>Cosmospora</i> sp.</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 0.2 μM [76, 77]</p>
 <p>Ácido tanzawaico A (11)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. SF-6013</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 8.2 μM [78]</p>

**Tabla 2.** Inhibidores de PTP1B de origen fúngico (continuación).

Metabolito	Fuente de obtención	CI <sub>50</sub> /Referencia
 <p>Pirano[4,3-c]isochromen-4-ona (12)</p>	<p><i>Phellinus igniarius</i></p>	<p>IC<sub>50</sub> = 3.1 μM [79]</p>
 <p>Guignardina C (13)</p>	<p><i>Guignardia</i> sp.</p>	<p>IC<sub>50</sub> = 25.7 μM [80]</p>
 <p>Fumosorinona (14)</p>	<p><i>Isaria fumosorosea</i></p>	<p>IC<sub>50</sub> = 14.0 μM [81]</p>

## 2. 5. Género *Talaromyces*

### 2. 5. 1. Generalidades

Los hongos han sido conocidos durante mucho tiempo por su capacidad para producir productos naturales con una amplia variedad de estructuras químicas y diversas actividades biológicas. Entre ellos, los hongos en el género *Talaromyces* producen varios metabolitos secundarios con actividades biológicas interesantes y nuevas estructuras que incluyen sesquiterpenos, macrólidos y péptidos cíclicos [82].

El género *Talaromyces*, un estado sexual del género *Penicillium*, fue introducido por Chester R. Benjamin en 1955. Pertenece a la familia *Trichocomaceae* y al orden Eurotiales. Algunas especies han sido aisladas del suelo, plantas, esponjas y alimentos. Éstas se utilizan en la producción

alimentaria y agrícola. Estudios anteriores sobre metabolitos secundarios de especies de *Talaromyces* han dado como resultado el aislamiento de diferentes tipos de compuestos como alcaloides, alcaloides indólicos, derivados del ácido tetrámico, poliésteres, derivados de difenil éter lactona, meroterpenoides, dímeros de oxafenalenona, quinonas, esteroides y terpenoides [83]. La mayoría de los compuestos aislados hasta la fecha han mostrado diversas actividades, como citotóxica contra líneas celulares de cáncer; antibacteriana, así como la inhibición de acetilcolinesterasa. Por lo tanto, la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de especies del género *Talaromyces* sigue siendo de interés.

Chester R. Benjamin estableció que el nuevo género *Talaromyces* describe las especies de *Penicillium* que, en sus ciclos de vida sexual, poseen ascocarpos suaves que exhiben un crecimiento indeterminado y cuyas paredes están compuestas de hifas entrelazadas. Las especies de *Talaromyces* se han dividido en cuatro secciones basadas en las estructuras de sus estados conidiales [84] (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Resumen de las principales clasificaciones subgenéricas de especies de *Talaromyces*.

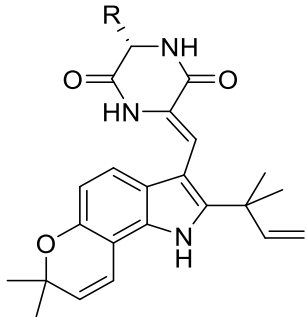
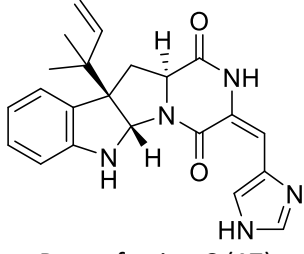
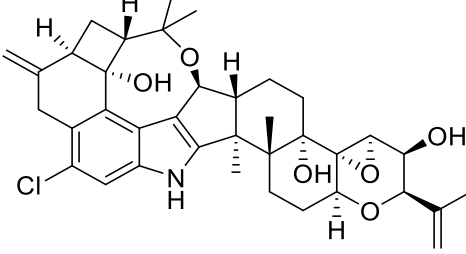
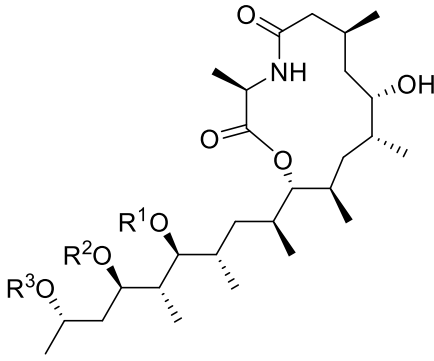
<b>Stolk &amp; Samson [85]</b>	<b>Yaguchi <i>et. al.</i> [86]</b>	<b>Yilmaz <i>et. al.</i> [87]</b>
Sección <i>Emersonii</i>	Sección <i>Emeronii</i>	Sección <i>Bacillispori</i>
Sección <i>Purpurea</i>	Sección <i>Purpurea</i>	Sección <i>Helici</i>
Sección <i>Talaromyces</i>	Sección <i>Talaromyces</i>	Sección <i>Islandici</i>
Sección <i>Thermophila</i>	Sección <i>Thermophila</i>	Sección <i>Purpurei</i>
	Sección <i>Trachyspermus</i>	Sección <i>Talaromyces</i>
		Sección <i>Subinflati</i>
		Sección <i>Trachyspermi</i>

Existen 88 especies aceptadas y clasificadas en las siete secciones de Yilmaz *et. al.* Las especies de *Talaromyces* generalmente producen pigmentos amarillos, naranjas y rojos en el micelio o como pigmentos difusores. Las especies sexuales de éste género son generalmente homotálicas. Las especies de *Talaromyces* generalmente crecen bien en medio MEA (Agar de extracto de malta) y CYA (agar de extracto de levadura Czapek). La mayoría de las especies de este género producen conidios y ascosporas elipsoidales. *Talaromyces* produce metabolitos secundarios únicos y específicos, tales como duclauxinas, ácidos glaucónicos, mitorubrininas, monascinas, purpactinas y rubratoxinas, entre otros [87].

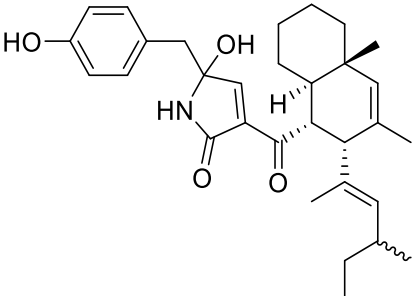
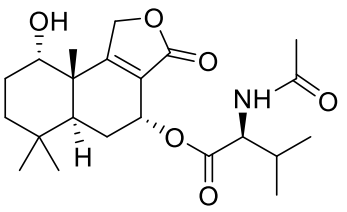
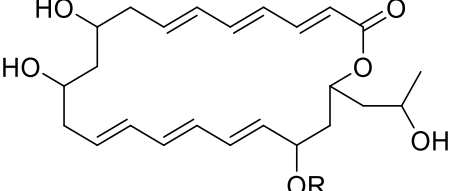
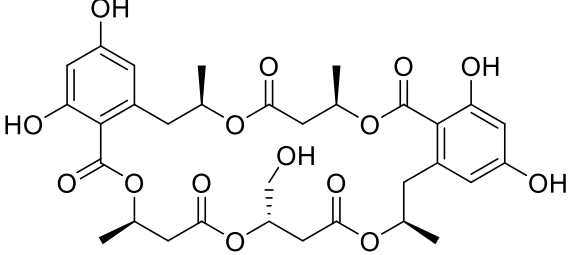
### **2. 5. 2. Metabolitos representativos del género *Talaromyces***

El género *Talaromyces* es un género ubicuo y de importancia debido a los productos naturales que producen sus miembros. *T. flavus*, por ejemplo, es un microorganismo notable por sus metabolitos secundarios con actividades biológicas únicas, es la especie más común del género [88]. Algunos ejemplos de los metabolitos bioactivos aislados de diferentes especies del género *Talaromyces* se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Metabolitos bioactivos representativos del género *Talaromyces*.

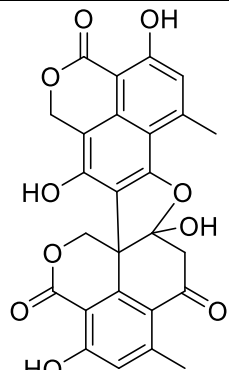
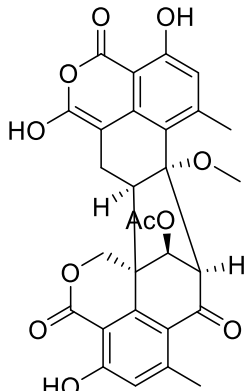
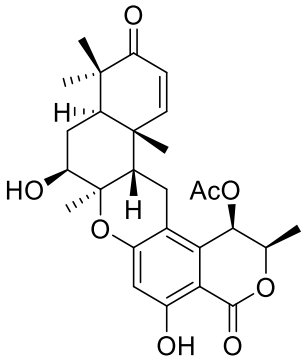
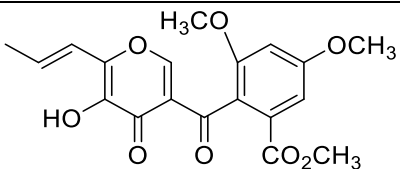
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica/Referencia
 <p>R = H; Talatermofilina A (15) R = CH<sub>3</sub>; Talatermofilina B (16)</p>	<p><i>T. thermophilus</i> YM1-3</p>	<p>Nematicida [89]</p>
 <p>Roquefortina C (17)</p>	<p><i>Talaromyces</i> sp. cf-16</p>	<p>Insecticida y antimicrobiano [90]</p>
 <p>Penitrem A (18)</p>	<p><i>Talaromyces</i> sp. cf-16</p>	<p>Insecticida y antimicrobiano [90]</p>
 <p>R<sup>1</sup> = R<sup>3</sup> = H; R<sup>2</sup> = Ac; Termolida A (19) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H; R<sup>3</sup> = Ac; Termolida B (20)</p>	<p><i>T. thermophilus</i> YM3-4</p>	<p>Nematicida [91]</p>

**Tabla 4.** Metabolitos bioactivos representativos del género *Talaromyces* (continuación).

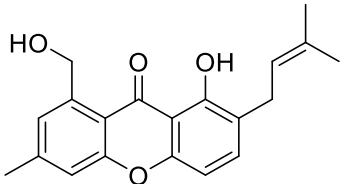
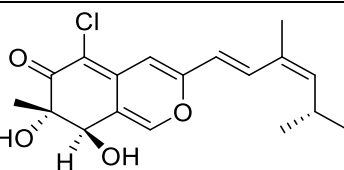
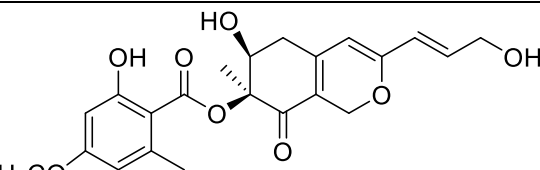
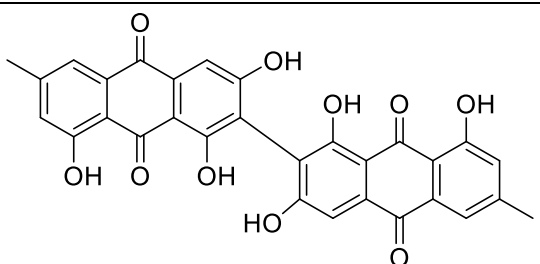
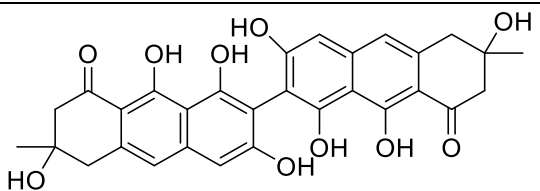
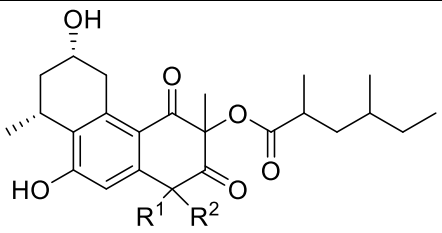
Metabolito	Especie productora	Actividad biológica/Referencia
 <p>Talaroconvolutina B (<b>21</b>)</p>	<i>T. convolutes</i>	Antifúngico [91]
 <p>Minioluteumida D (<b>22</b>)</p>	<i>T. minioluteus</i>	Citotoxicidad contra HepG2 [92]
<b>Ésteres</b>		
 <p>R = H; Wortmannilactona C (<b>23</b>) R = CH<sub>3</sub>; Wortmannilactona D (<b>24</b>)</p>	<i>T. wortmannii</i>	Citotoxicidad contra células cancerígenas humanas (HCT-5, HCT-115, A549, MDA-MB-231 y K562) [93]
 <p>15G256α (<b>25</b>)</p>	<i>T. flavus</i> BYD07-13	Antimicrobiano [94]



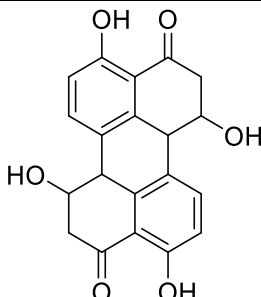
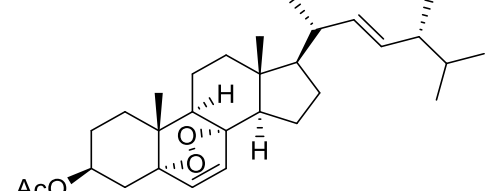
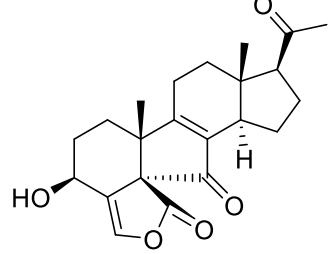
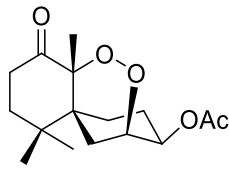
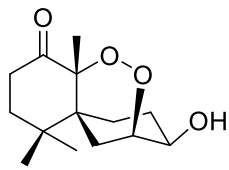
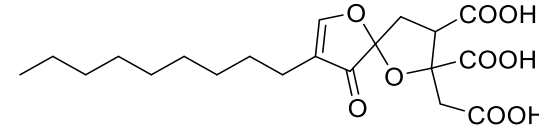
**Tabla 4.** Metabolitos bioactivos representativos del género *Talaromyces* (continuación).

Metabolito	Especie productora	Actividad biológica/Referencia
 <p>Bacillisporina C (<b>26</b>)</p>	<i>T. bacillosporus</i>	Antibacteriano [95]
 <p>Talaromycesona A (<b>27</b>)</p>	<i>Talaromyces</i> sp. LF458	Antibacteriano e inhibidor de acetilcolinesterasa [96]
 <p>Crodrimanina B (<b>28</b>)</p>	<i>Talaromyces</i> sp. YO-2	Insecticida [97]
<b>Policétidos</b>		
 <p>Funicona (<b>29</b>)</p>	<i>T. flaus</i> IFM52668	Antifúngico [98]

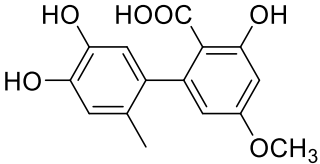
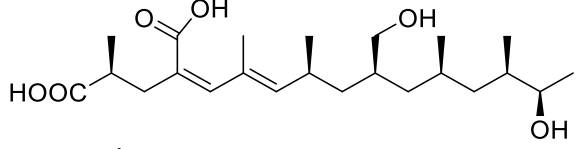
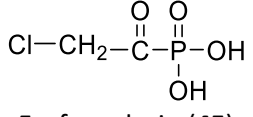
**Tabla 4.** Metabolitos bioactivos representativos del género *Talaromyces* (continuación).

Metabolito	Especie productora	Actividad biológica/Referencia
 <p>Talaroxantenona (30)</p>	<p><i>Talaromyces</i> sp. LF458</p>	<p>Inhibidor de acetilcolinesterasa y fosfodiesterasa PDE-4B2 [96]</p>
 <p>Luteusina B (31)</p>	<p><i>T. luctus</i></p>	<p>Inhibidor de la monoamina oxidasa (MAO) [99]</p>
 <p>Kasanosina B (32)</p>	<p><i>Talaromyces</i> sp.</p>	<p>Inhibidor de las DNA polimerasas <math>\beta</math> y <math>\lambda</math> eucarióticas de la familia X de las polimerasas [100]</p>
<b>Quinonas</b>		
 <p>Biemodin (33)</p>	<p><i>T. wortmannii</i></p>	<p>Antibiótico [101]</p>
 <p>Flavomannin A (34)</p>	<p><i>T. wortmannii</i></p>	<p>Antibacteriano [102]</p>
 <p>R<sup>1</sup> = OH; R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>; Vanitaracin A (35) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H; Vanitaracin B (36)</p>	<p><i>Talaromyces</i> sp.</p>	<p>Actividad anti-HBV [103]</p>

**Tabla 4.** Metabolitos bioactivos representativos del género *Talaromyces* (continuación).

Metabolito	Especie productora	Actividad biológica/Referencia
 <p>Estemfiperilenol (<b>37</b>)</p>	<p><i>Talaromyces</i> sp. ZH-154</p>	<p>Antibiótico [104]</p>
<b>Esteroides y terpenoides</b>		
 <p>3-acetilergosterol 5,8-endoperoxido (<b>38</b>)</p>	<p><i>T.</i> <i>trachyspermus</i></p>	<p>Antimicrobiano e inhibidor leve de la monoamina oxidasa (MAO) [28]</p>
 <p>Secovironolido (<b>39</b>)</p>	<p><i>T. wortmanni</i></p>	<p>Inhibidor moderado de la monoamina oxidasa (MAO) [88]</p>
 <p>Talaperóxido B (<b>40</b>)</p>	<p><i>T. flavus</i></p>	<p>Actividad citotóxica contra líneas cancerígenas MCF- 7, MDA-MB-435, HepG2, HeLa, y PC-3 [105]</p>
 <p>Esteperóxido B (<b>41</b>)</p>	<p><i>T. flavus</i></p>	<p>Actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas MCF-7, MDA-MB-435, HepG2, HeLa, y PC-3 [105]</p>
<b>Otros</b>		
 <p>Ácido traquípico (<b>42</b>)</p>	<p><i>T.</i> <i>trachyspermus</i></p>	<p>Inhibidor de la heparanasa [106]</p>

**Tabla 4.** Metabolitos bioactivos representativos del género *Talaromyces* (continuación).

 <p>Altenusina (<b>43</b>)</p>	<p><i>T. flavus</i></p>	<p>Inhibidor de la integrasa HIV-1 [107]</p>
 <p>Ácido 2-hidroxiiradiclonico (<b>44</b>)</p>	<p><i>T. pinophilus</i> AF-02</p>	<p>Antibacteriano [108]</p>
 <p>Fosfonoclorin (<b>45</b>)</p>	<p><i>T. flavus</i></p>	<p>Antibiótico [109]</p>

## 2. 6. Fenalenonas

### 2. 6. 1. Generalidades

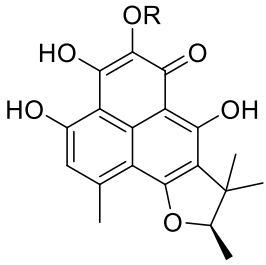
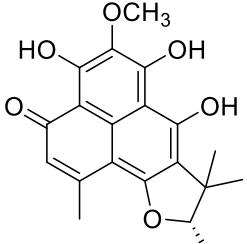
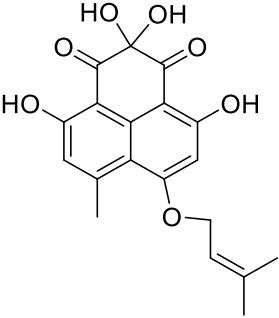
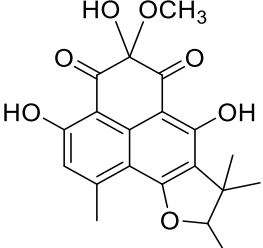
Las fenalenonas son una clase única de productos naturales con sistemas de tres anillos de hidroxil-perinaftenonas que poseen actividades biológicas diversas, tales como antimicrobiana, antimalárica, citotóxica y anti-VIH. Los microorganismos fúngicos son fuente importantes de fenalenonas con diversas estructuras originadas a partir de policétidos [110].

Los hongos que habitan en el suelo constituyen una comunidad extremadamente diversa que producen una variedad de policétidos aromáticos estructuralmente interesantes, como los dímeros de oxafenalenona relacionados con las duclauxinas [111]. Los policétidos constan de estructuras complejas que han atraído un gran interés debido a sus actividades biológicas, que pueden conducir a nuevas aplicaciones medicinales o agroquímicas [112, 113].

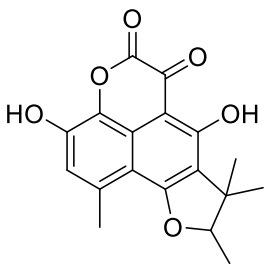
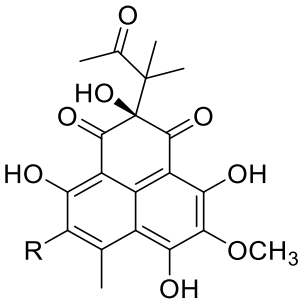
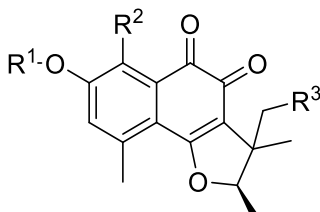
Las duclauxinas tienen diversas actividades, por ejemplo, la duclauxina (**64**) y la criptoclauxina (**65**) exhiben supresión tumoral al inhibir la síntesis de ARN o la síntesis de ATP mitocondrial, y la talaromycesona B (**75**) es un inhibidor de la acetilcolinesterasa [114]. Las variaciones estructurales entre duclauxinas se atribuyen a diferentes monómeros de oxafenalenona y la conectividad entre ellas.

En 1955 el núcleo de fenaleno se identificó como un producto natural de los hongos microscópicos. Según el número de átomos de carbono en el precursor, y debido a la derivación oxidativa, las fenalenonas se clasifican en varios subgrupos [115], que se mencionan en la **Tabla 5**.

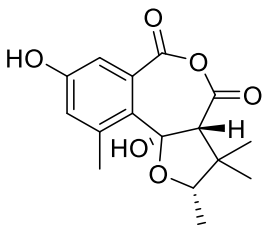
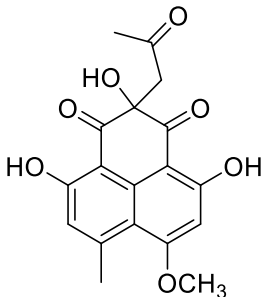
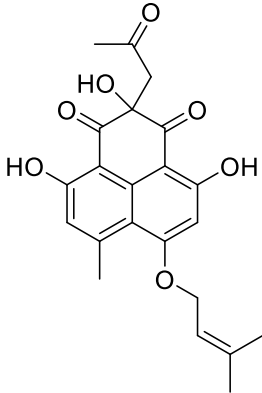
**Tabla 5.** Fenalenonas representativas de cada subgrupo.

Molécula	Fuente de obtención/Referencia	Actividad biológica
<b>Heptacétidos</b>		
 <p>R = H; (+)-atrovenetin (<b>46</b>) R = CH<sub>3</sub>; (+)-deoxyherqueinona (<b>47</b>)</p>	<p><i>Penicillium atrovenetum</i>, <i>P. herquei</i>, <i>P. paraherquei</i> [116-118]</p>	<p>Antioxidante y antibacteriano</p>
 <p>Erabulenol A (<b>48</b>)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. FO-5637 [119-121]</p>	<p>Inhibidor de la proteína CETP (enfermedades ateroscleróticas)</p>
 <p>Rousselianona A (<b>49</b>)</p>	<p><i>Phaeosphaeria rousseliana</i> [122]</p>	<p>Antibiótico y antifúngico</p>
 <p>Atrovenetinona MS-323 (<b>50</b>)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. [123, 124]</p>	<p>Inhibidor de calmodulina y de la integrasa HIV-1</p>

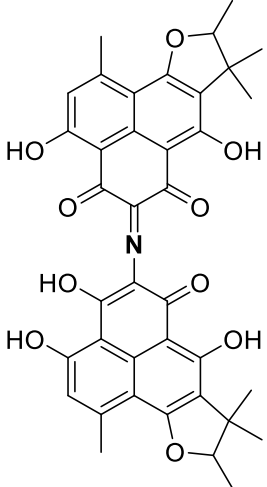
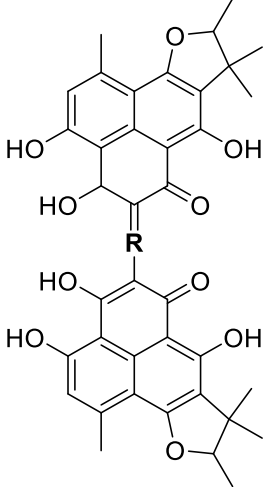
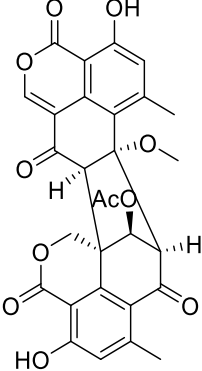
**Tabla 5.** Fenalenonas representativas de cada subgrupo (continuación).

Molécula	Fuente de obtención/Referencia	Actividad biológica
 <p>Escleroderolida (<b>51</b>)</p>	<p><i>Godronia abietina</i>, <i>G. cassandrae</i>, <i>Penicillium</i> sp. FO-5637 y <i>C. cereale</i> [125, 126]</p>	<p>Antimicrobiano</p>
 <p>R = H; Esculezonona A (<b>52</b>) R = OH; Esculezonona B (<b>53</b>)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. [127]</p>	<p>Antitumoral</p>
<b>Hexacétidos</b>		
 <p>R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H; (+)-tripetelona (<b>54</b>) R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H; tripetelona metil éter (<b>55</b>) R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = OCH<sub>3</sub>; R<sup>3</sup> = H; metoxitripetelona metil éter (<b>56</b>) R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = OCH<sub>3</sub>; R<sup>3</sup> = OH; 4-hidroxi-8-metoxitripetelona metil éter (<b>57</b>)</p>	<p><i>Astrothelium</i> sp. [128]</p>	<p>Antibióticos</p>

**Tabla 5.** Fenalenonas representativas de cada subgrupo (continuación).

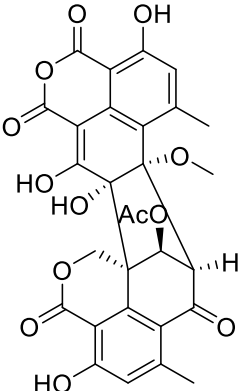
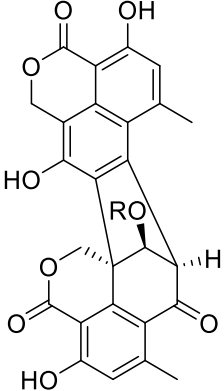
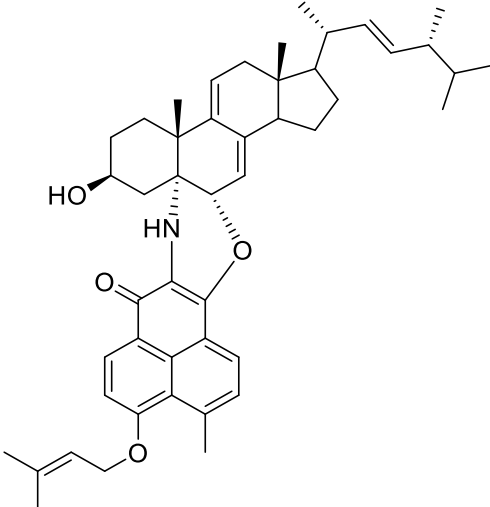
Molécula	Fuente de obtención/Referencia	Actividad biológica
 <p>Cereoanhidrido (58)</p>	<p><i>Coniothyrium cereale</i> [122]</p>	<p>Antibacteriano</p>
<b>Aductos de acetona</b>		
 <p>FR-901235 (59)</p>	<p><i>Paecilomyces carneus</i> F-4882 [129]</p>	<p>Efecto inmunomodulador</p>
 <p>Rousselianona A' (60)</p>	<p><i>Phaeosphaeria rousseliana</i> [122]</p>	<p>Antimicrobiano</p>

**Tabla 5.** Fenalenonas representativas de cada subgrupo (continuación).

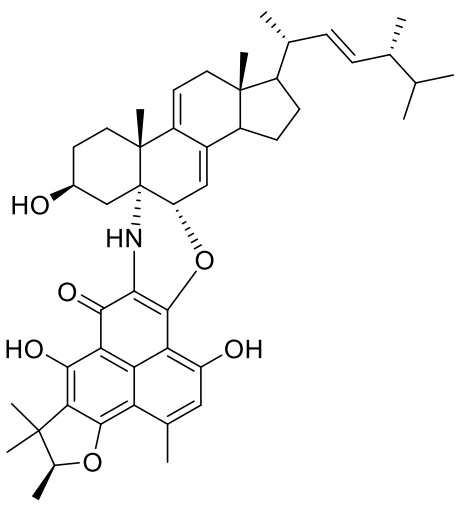
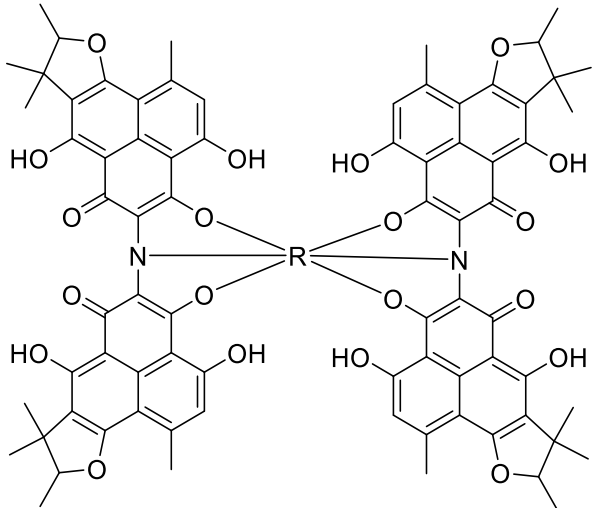
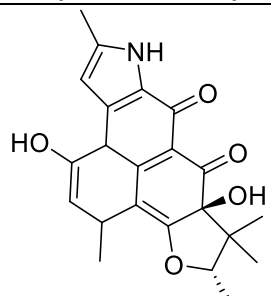
Molécula	Fuente de obtención/Referencia	Actividad biológica
<b>Homodímeros</b>		
 <p>Escleroderris azul (<b>61</b>)</p>	<p><i>G. abietina</i> [130]</p>	<p>Pigmento y herbicida</p>
 <p>R = NH; Escleroderris verde (<b>62</b>) R = CH<sub>2</sub>; Escleroderris amarillo (<b>63</b>)</p>	<p><i>G. cassandrae</i>, <i>G. abietina</i> [126]</p>	<p>Herbicidas</p>
<b>Oxafenalenonas</b>		
 <p>Duclauxina (<b>64</b>)</p>	<p><i>T. bacillusporus</i>, <i>T. duclauxi</i>, <i>P. herquei</i> (ATCC 34665) y <i>T. Stipitatum</i>. [131]</p>	<p>Citotóxico contra las líneas tumorales MCF-7, NCI-H-460, SF-268 y antitumoral</p>



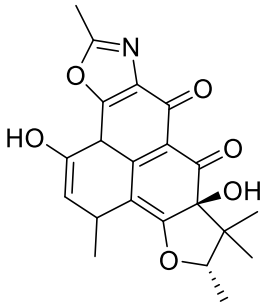
**Tabla 5.** Fenalenonas representativas de cada subgrupo (continuación).

Molécula	Fuente de obtención/Referencia	Actividad biológica
 <p>Cryptoclauxina (<b>65</b>)</p>	<p><i>T. duclauxi</i> [131]</p>	<p>Citotóxico</p>
 <p>R = Ac; Bacillosporina A (<b>66</b>) R = H; Bacillosporina B (<b>67</b>)</p>	<p><i>Talaromyces bacillosporus</i> [130]</p>	<p>Antibacterianos y anticancerígenos</p>
<b>Heterodímeros</b>		
 <p>Conio-azasirosterol (<b>68</b>)</p>	<p><i>C. cereale</i> [132]</p>	<p>Antimicrobiano</p>

**Tabla 5.** Fenalenonas representativas de cada subgrupo (continuación).

Molécula	Fuente de obtención/Referencia	Actividad biológica
 <p>Cereo-azasirosterol (<b>69</b>)</p>	<p><i>C. cereale</i> [132]</p>	<p>Antimicrobiano</p>
<b>Complejos metálicos</b>		
 <p>R = Ni; Complejo níquelado de escleroderris azul (<b>70</b>) R = Zn; Complejo de zinc de escleroderris azul (<b>71</b>)</p>		<p><i>R. hypogea</i> y <i>P. herquei</i> [133]</p>
<b>Compuestos que contienen pirrol y oxazol</b>		
 <p>Herqueiazol (<b>72</b>)</p>	<p><i>Penicillium</i> sp. [134]</p>	<p>Citotóxico</p>

**Tabla 5.** Fenalenonas representativas de cada subgrupo (continuación).

Molécula	Fuente de obtención/Referencia	Actividad biológica
 <p data-bbox="370 604 597 632">Herqueioxazol (<b>73</b>)</p>	<p data-bbox="849 436 1019 499"><i>Penicillium</i> sp. [134]</p>	<p data-bbox="1224 453 1344 480">Citotóxico</p>

Como se puede observar, las fenalenonas las producen en su mayoría hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Paecilomyces* y *Coniothyrium*. La gran química nucleofílica del núcleo de fenalenona, en la que todas las posiciones de este núcleo son susceptibles de ataques electrofílicos, ha sido ampliamente explotada por hongos para crear una sorprendente variedad de sustancias naturales muy interesantes estructuralmente [115].

### 3. Justificación

Debido a que tanto la DM, la obesidad y el cáncer impactan en la calidad y esperanza de vida de un gran número de personas tanto a nivel global como a nivel nacional, la investigación en el descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de estos padecimientos es fundamental e incluso urgente, pues los números de afectados va creciendo a pasos agigantados por los malos hábitos alimenticios, la falta de actividad física y el deterioro de las condiciones ambientales. Sin embargo, aún con los muchos avances que se han logrado en el tratamiento de estos padecimientos en los años recientes, quedan aún muchos desafíos por vencer, pues si bien existen muchos fármacos para tratar estas enfermedades, tanto sintéticos como de origen natural, la mayoría no son completamente eficaces y/o seguros, por lo que la búsqueda de nuevos fármacos con menos efectos adversos, más selectivos y eficaces para tratar estas enfermedades continúa.

Se ha demostrado que la PTP1B es un blanco prometedor para tratar la DMII, la obesidad y algunos tipos de cáncer. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los inhibidores de PTP1B que han sido descubiertos presentan problemas importantes debido a su escasa selectividad. En ese sentido, la búsqueda de agentes inhibidores de la PTP1B a partir de productos naturales obtenidos de hongos aislados de nichos ecológicos poco explorados supone una estrategia factible en la identificación de moléculas novedosas que sean útiles en la terapéutica de dichos padecimientos.

Los productos naturales al día de hoy están resurgiendo con fuerza en el arsenal médico ya que en general suelen ser más selectivos y/o seguros que los medicamentos de origen sintético. En particular, es importante mencionar que no es posible discernir si los inhibidores de PTP1B de origen fúngico son más selectivos y/o potentes que los inhibidores de PTP1B de otras fuentes naturales o de origen sintético debido a que en los tres grupos hay una gran diversidad tanto estructural como de actividad inhibitoria sobre la PTP1B. Sería pertinente realizar estudios quimioinformáticos para establecer las diferencias de selectividad y potencia entre inhibidores fúngicos, de plantas y de síntesis sobre la PTP1B. En este trabajo se eligió trabajar con metabolitos secundarios aislados de hongos microscópicos ya que muy pocos de ellos han sido estudiados a detalle a pesar de que en nuestro país existe una gran diversidad de estos microorganismos.

Por lo tanto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal la obtención de inhibidores no competitivos y/o alostéricos de la PTP1B a partir de microorganismos fúngicos aislados de regiones poco exploradas de México. Se espera que los compuestos aislados tengan mayor selectividad que los inhibidores ya existentes al presentar un tipo de inhibición diferente a la competitiva, evitando así la unión en el sitio catalítico de la enzima que es altamente conservado en las más de 100 PTPs presentes en el ser humano.

#### 4. Hipótesis

Considerando que las especies del género *Talaromyces* biosintetizan metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, por ejemplo propiedades antibióticas, antitumorales, herbicidas o insecticidas así como propiedades inhibitorias sobre diferentes enzimas como la acetilcolinesterasa, integrasa HIV-1, CETP, fosfodiasterasa PDE-4B2, MAO, ADN polimerasas o heparanasa, es probable que la especie *Talaromyces* sp. (IQ-313) aislada de muestras de tierra de hormiguero produzca compuestos con actividad inhibitoria contra la enzima *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

## 5. Objetivos

### 5. 1. Objetivo general

Aislar, identificar y caracterizar los metabolitos secundarios fúngicos con actividad inhibitoria sobre la proteína tirosina fosfatasa 1B (*hPTP1B<sub>1-400</sub>*), a partir de especies fúngicas de muestras de hormiguero para el desarrollo de fármacos útiles en el tratamiento de la DMTII, obesidad, algunos tipos de cáncer, o bien, como herramientas para futuras investigaciones.

### 5. 2. Objetivos particulares

- Aislar y cultivar los microorganismos fúngicos de muestras de hormiguero recolectadas en la Huasteca Hidalguense.
- Obtener el extracto orgánico de los microorganismos cultivados.
- Establecer un método enzimático con la *hPTP1B<sub>1-400</sub>* para la búsqueda de PN de origen fúngico con potencial hipoglucemiante o antitumoral.
- Identificar taxonómicamente el microorganismo fúngico seleccionado.
- Aislar los metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico activo seleccionado mediante técnicas cromatográficas.
- Caracterizar químicamente los metabolitos secundarios aislados utilizando técnicas espectrométricas y espectroscópicas.
- Evaluar la actividad de los metabolitos aislados como inhibidores de la *hPTP1B<sub>1-400</sub>*.
- Identificar el tipo de inhibición de los metabolitos evaluados sobre la *hPTP1B<sub>1-400</sub>*.
- Establecer el probable sitio de unión de los metabolitos bioactivos con la *hPTP1B<sub>1-300</sub>* mediante estudios de acoplamiento molecular.

## 6. Metodología

### 6. 1. Obtención de muestras para el aislamiento de especies fúngicas

Las muestras biológicas obtenidas para el aislamiento de microorganismos fúngicos se recolectaron en la zona de la Huasteca Hidalguense, en el estado de Hidalgo (Figura 15 y 16).

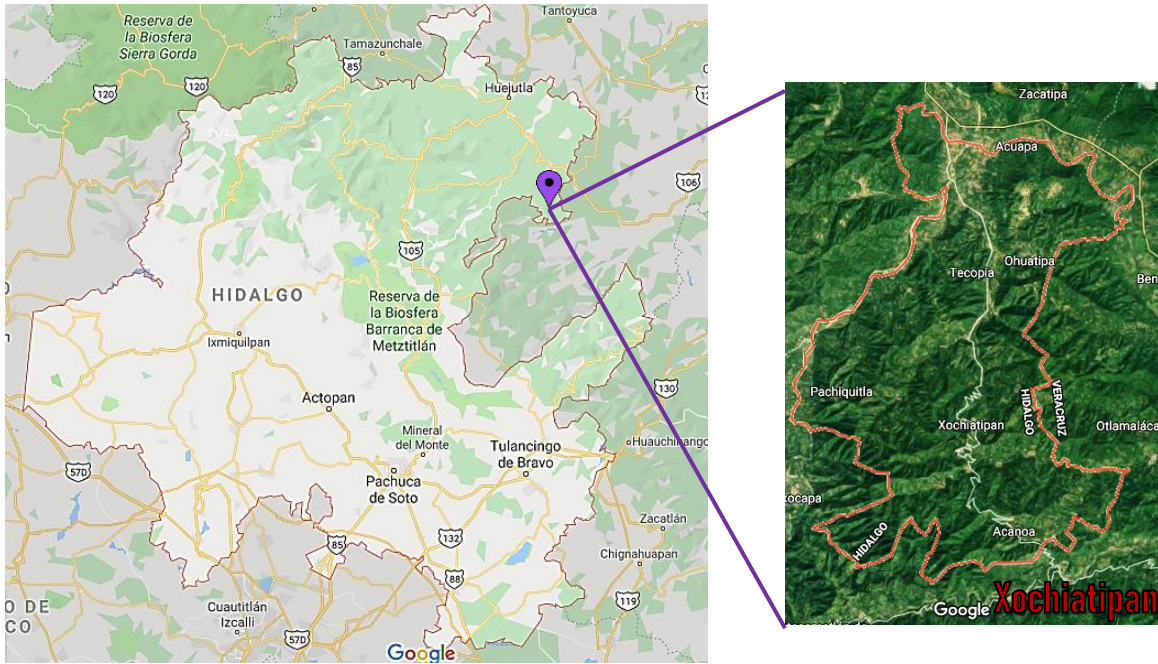


Figura 15. Ubicación del municipio de Xochiatipan en la Huasteca Hidalguense, Hidalgo (20°50'02"N 98°17'03"O).



Figura 16. Tierra de hormiguero de donde se colectaron las muestras.

## 6. 2 Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos

El aislamiento de los microorganismos fúngicos a partir de las muestras de tierra de hormiguero se realizó mediante diluciones seriadas. La solución stock se preparó con 1 g de tierra y se añadieron 9 mL de agua destilada estéril.

A partir de la suspensión se realizaron diluciones para tener cuatro soluciones en concentración de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  g tierra/mL. Posteriormente se tomaron 200  $\mu$ L de cada disolución y se inocularon en una caja de Petri con medio agar papa dextrosa (APD) y amoxicilina (500 mg/L). Este procedimiento se realizó por duplicado. Dichas cajas se dejaron en crecimiento por aproximadamente 48-72 horas a temperatura ambiente, y se monitoreó el crecimiento de los microorganismos fúngicos.

Una vez aislados los microorganismos fúngicos, se les asignó una clave consecutiva de identificación alfanumérica (IQ-311 a IQ-320) y se realizó un registro fotográfico de cada uno. Para ello se prepararon dos cultivos semilla en tubos para centrifuga Falcon con 15 mL de medio caldo papa dextrosa (CPD). Posteriormente, los cultivos semilla se vertieron a dos matraces, uno con 12 g de arroz y otro con 10 g de cereal Cheerios®. Los cultivos se dejaron crecer por 30 días a temperatura ambiente con periodos normales de luz y oscuridad.

## 6. 3. Obtención de los extractos orgánicos

Para este trabajo se seleccionaron los hongos del IQ-311 al IQ-314 para su estudio químico y biológico. A cada matraz de arroz y de Cheerios® con cultivo se le añadieron 60 mL de una mezcla 1:1 de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH y con una espátula se fragmentó la biomasa y se dejó macerar con agitación por aproximadamente 24 horas. Posteriormente transcurridas las 24 horas los cultivos se filtraron al vacío y el residuo sólido se lavó con 90 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Después a las muestras bifásicas resultantes se les añadieron 75 mL de agua destilada y se colocaron en agitación por 15 minutos. Las mezclas bifásicas se transfirieron a un embudo de separación para realizar un proceso de partición. Las fracciones orgánicas se concentraron a presión reducida en rotavapor. Finalmente los extractos orgánicos resultantes se reconstituyeron con 100 mL de una mezcla 1:1 de MeOH:MeCN y se sometieron a un proceso de reparto con 100 mL de hexano. Las mezclas bifásicas se transfirieron a un embudo de separación y la fase de MeOH:MeCN se concentró a presión reducida y se colocaron en viales para su posterior análisis (**Tabla 6**). Las fracciones hexánicas se descartaron.

**Tabla 6.** Obtención de extractos orgánicos de los hongos cultivados en Cheerios® (C) y Arroz (A).

Experimento	Código	Rendimiento (mg)
IQ-311 C	01001-94-1	100.7
IQ-311 A	01001-94-2	73.4
IQ-312 C	01001-94-3	53.7
IQ-312 A	01001-94-4	43.1
IQ-313 C	01001-94-5	951.6
IQ-313 A	01001-94-6	890.0
IQ-314 C	01001-94-7	60.2
IQ-314 A	01001-94-8	34.3



#### 6. 4. Procedimientos cromatográficos generales

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se realizaron utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de Merck (tamaño de partícula 3.5-7.0 ASTM y de 0.25 mm de espesor). Como eluyentes se emplearon diversas mezclas de disolventes orgánicos (hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH). La visualización de las placas se realizó empleando una lámpara de UV a 250 y 365 nm. Como agente revelador se utilizó sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico concentrado.

Los análisis cromatográficos en columna abierta (CCA) se realizaron con gel de sílice como fase estacionaria (Macherey-Nagel 230-400) y como fase móvil mezclas de polaridad creciente de hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y también se realizó con fase estacionaria de Sephadex LH-20 y como fase móvil MeOH.

Los análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se ejecutaron en un equipo marca Waters, equipado con un detector UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2998), un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo así como la adquisición y manejo de los datos, se efectuó con el programa Empower versión 3.0 Waters. Los análisis cromatográficos de tipo analítico se hicieron en una columna Phenomenex Gemini NX-C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm) y para los análisis semipreparativos se empleó una columna Phenomenex Gemini NX-C18 (5 µm, 250 × 10 mm). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. La detección de los compuestos se realizó a diferentes longitudes de onda (200-800 nm).

#### 6. 5. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-<sup>1</sup>H 700 MHz) y de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C, 175 MHz) se registraron en un equipo de Bruker Ascend III 700, utilizando metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD), acetona deuterada (CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>), y cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como referencia para los desplazamientos químicos (δ).

Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) con un espectrómetro de masas Jeol, AccuTOF JMS-T100LC y/o por electrospray empleando un equipo QExactive Plus (ThermoFisher, San Jose, CA, USA).

#### 6. 6. Expresión y purificación de la enzima hPTP1B<sub>1-400</sub>

La proteína PTP1B en la construcción genética pET27b(+)-PTP1B fue donada por el Dr. Martin González Andrade de la Facultad de Medicina de la UNAM. La construcción genética se amplificó en la célula competente DH5-α. Posteriormente, los plásmidos obtenidos se emplearon para transformar las células competentes BL21 (DE3) PLYS, mediante choque térmico y se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina después de 16 h de incubación a 37 °C. Las colonias seleccionadas se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm en medio líquido Luria-Beratani (LB, 3 mL), suplementado con el antibiótico. La inducción de las células se realizó con IPTG 0.5 mM a 37 °C. La expresión de la enzima PTP1B se monitoreó cada 2 h empleando geles desnaturalizantes de SDS-PAGE. En el escalamiento (4 L), transcurrido el periodo de incubación, las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 6000 rpm por 10 min, a 4 °C. La lisis celular se realizó mediante choques sónicos. El paquete celular se resuspendió en un amortiguador de 50 mM de TRIS-HCl pH 7.3, 150 mM de NaCl, 1 mM de PMSF. El extracto celular

obtenido de la lisis se purificó por cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Source 15Q y un gradiente de 50 mM de TRIS-HCl pH 8.3, 0 mM NaCl a 50 mM de TRIS-HCl pH 8.3, 1 M NaCl. Con la finalidad de seguir a la proteína en cada paso del proceso de purificación se monitoreó la actividad enzimática empleando fosfato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPP) como sustrato, en amortiguador de 50 mM TRIS-HCl pH 8.3. Cabe mencionar que se detectó actividad enzimática a lo largo del proceso de purificación, sin embargo, esta se pierde en el último paso de purificación. Con la finalidad de dar solución a los problemas presentados y evitar la manipulación de la proteína por periodos de tiempo prolongados, el gen de la proteína PTP1B<sub>1-400</sub> se transfirió al vector pET28, mismo que está flanqueado por una etiqueta de histidinas (6 × His) en el extremo amino terminal de la proteína. La expresión del plásmido se realizó en células competentes de *E. coli* Rosseta (4L) a 37 °C por 18 h, empleando 0.5 mM de IPTG para la inducción. Transcurrido el periodo de incubación, las células se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 6000 rpm por 10 min, a 4 °C. La lisis celular se realizó mediante choques sónicos. El paquete celular se resuspendió en un amortiguador de 50 mM de Hepes pH 7.3, 150 mM de NaCl, 1 mM de PMSF y 1.5 mM DTT. El extracto celular obtenido de la lisis se purificó por cromatografía de afinidad a níquel utilizando una columna Ni<sup>2+</sup> HisTrap de 5 mL a un flujo de 1 mL/min. La elución de la muestra se realizó empleando un amortiguador de 50 mM Hepes pH 7.3, 100 mM NaCl, 1.5 mM DTT y 300 mM de imidazol. Con la finalidad de seguir a la proteína en cada paso del proceso de purificación, se monitoreó la actividad enzimática empleando fosfato de *p*-nitrofenilo como sustrato en amortiguador de 50 mM Hepes pH 6.8, 100 mM NaCl y 1.5 mM DTT. Adicionalmente, la pureza de la proteína se monitoreó por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE al 10 %). Las muestras que presentaron actividad enzimática y un perfil electroforético similar se reunieron y dializaron contra amortiguador de 50 mM Hepes pH 6.8, 100 mM NaCl y 1.5 mM DTT.

#### **6. 7. Establecimiento de un método enzimático con la hPTP1B<sub>1-400</sub> para la búsqueda de compuestos de origen fúngico con potencial hipoglucemiante y antitumoral**

Se implementó un método enzimático para la evaluación de extractos orgánicos y compuestos puros como inhibidores de la enzima hPTP1B<sub>1-400</sub>. Para ello, se estableció la linealidad del sistema y posteriormente se determinó la velocidad inicial de la reacción enzimática y se obtuvieron los valores de  $K_m$  y  $V_m$ . Finalmente, con las condiciones obtenidas a partir de la caracterización cinética de la enzima se determinó la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) del control positivo, ácido ursólico (74).

##### **6. 7. 1. Curva patrón de *p*-NP**

La curva patrón de *p*-NP se realizó por triplicado utilizando 6 disoluciones en un rango de concentración de 0.0-1.25 mM. Todas las disoluciones se prepararon a partir de una disolución stock y en buffer Hepes a pH de 6.8. Se colocaron 100  $\mu$ L de cada disolución en una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia.

##### **6. 7. 2. Curva de saturación por sustrato *p*-NPP**

Para la curva de saturación por sustrato se utilizaron soluciones de *p*-NPP en un rango de concentración de 0.0-10 mM. Para ello se preparó una disolución stock de 50 mM en buffer Hepes. Se colocaron 10  $\mu$ L de cada disolución en una placa de 96 pozos por duplicado, se agregaron 10  $\mu$ L

de enzima PTP1B de 300 nM y el volumen se completó a 100  $\mu$ L con el buffer. Se midió la absorbancia a los 0 y 20 minutos.

### 6. 7. 3. Curva de inhibición con ácido ursólico (74)

La curva de inhibición se realizó con disoluciones de ácido ursólico (74) en un rango de concentración de 0.0-100  $\mu$ M. Para ello se elaboró una solución stock de 10 mM en buffer Hepes. Se colocaron 2  $\mu$ L de cada disolución en una placa de 96 pozos, se añadieron 10  $\mu$ L de enzima PTP1B 300 nM y el volumen se completó a 90  $\mu$ L con el buffer. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 10 minutos. Posteriormente se adicionaron 10  $\mu$ L de sustrato *p*-NPP 30 mM y se registró la absorbancia. Nuevamente se incubó a 37°C por 20 minutos y una vez terminado el tiempo se midió la absorbancia. Con los valores obtenidos de tres repeticiones se calculó la  $CI_{50}$ .

### 6. 8. Ensayos de inhibición de hPTP1B<sub>1-400</sub>

El estudio de inhibición *in vitro* se efectuó con la hPTP1B<sub>1-400</sub> a una concentración de 300 nM. Como sustrato se utilizó *p*-NPP 30 mM. Los ensayos se realizaron en solución amortiguadora de pH 6.8 con Hepes 50 mM, 100  $\mu$ M NaCl, 1.5 mM DTT. El ácido ursólico (74) se utilizó como control positivo a 10  $\mu$ M. El extracto orgánico de IQ-313 y los compuestos puros aislados disueltos en DMSO se evaluaron a una concentración final de 200 ppm. La inhibición se determinó por espectrofotometría a 405 nm en placas de 96 pozos. Las absorbancias registradas se adquirieron con un lector Synergy HT y se analizaron mediante los softwares de Gen 5 y GraphPad Prism 6.0.

El porcentaje de inhibición de los extractos orgánicos se calculó con la siguiente ecuación y considerando la absorbancia del blanco:

$$\% Inh = \left( 1 - \frac{A_{m_{405\text{ nm}}}}{A_{b_{405\text{ nm}}}} \right) \times 100$$

Donde % Inh corresponde al porcentaje de inhibición de la enzima,  $A_{m_{405\text{ nm}}}$  a la absorbancia corregida de la muestra ( $A_{m_{405\text{ nm}}} = A_{20\text{ min. muestra } 405\text{ nm}} - A_{inicial\text{ muestra } 405\text{ nm}}$ ) y  $A_{b_{405\text{ nm}}}$  a la absorbancia corregida del blanco ( $A_{b_{405\text{ nm}}} = A_{20\text{ min. blanco } 405\text{ nm}} - A_{inicial\text{ blanco } 405\text{ nm}}$ ).

### 6. 9. Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado

La identificación taxonómica de la cepa seleccionada mediante secuenciación molecular de la región ITS y análisis de homología tipo BLAST utilizando la base de datos del *National Center Biotechnology Information* (NCBI) se realizó en colaboración con el Dr. Jesús Morales Jiménez, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) del estado de San Luis Potosí.

### 6. 10. Fraccionamiento primario del extracto orgánico de IQ-313 (*Talaromyces* sp).

Con la finalidad de obtener los metabolitos minoritarios presentes en el extracto orgánico de IQ-313 cultivado en Cheerios®, se realizó el escalamiento del cultivo (pequeña escala  $\times$  5). El extracto orgánico obtenido (01001-94-5, 4 g) se fraccionó por CCA, empleando sílica gel como fase estacionaria (CV = 350 mL) y mezclas de hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 (15 CV), hex/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8:2 (10.5 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% (10.5 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 9:1 (3.2 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 8:2 (2 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 7:3 (4 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 1:1 (4.5 CV), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt/MeOH 45:45:10 (6.4 CV) como fase móvil. Cada fracción se

monitoreó vía CCF y aquellas con patrones similares se reunieron, generando un conjunto de 12 fracciones (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Agrupamiento de fracciones primarias del extracto de IQ-313.

Grupo	Fracciones	Código	Rendimiento (mg)
1	1-4	01001-139-1	27.8
2	5-8	01001-139-2	25.2
3	9-16	01001-139-3	21.1
4	17-26	01001-139-4	121.8
5	27-30	01001-139-5	27.6
6	31-54	01001-139-6	807.3
7	55-73	01001-139-7	972.1
8	74-86	01001-139-8	1047.3
9	87-92	01001-139-9	108.7
10	93-98	01001-139-10	32.1
11	99-101	01001-139-11	470.7
12	102-104	01001-139-12	126.4
<b>Total</b>			3788.1
<b>Recuperado (%)</b>			94.7

#### 6. 11. Aislamiento de compuestos puros: duclauxina (64), talaromycesona B (75), xenoclauxina (76) y bacillisporina G (77).

##### 6. 11. 1. Aislamiento de duclauxina (64)

Se pesaron 100 mg del extracto 01001-94-5 del IQ-313 en un vial y se le agregaron 500 µL de MeOH. Una parte del compuesto se disolvió y se transfirió a otro vial. La parte insoluble se resuspendió con MeOH, se centrifugó y se separó el sobrenadante del sedimento. El procedimiento anterior se repitió dos veces y permitió obtener dos fracciones (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Separación del extracto 01001-94-5.

Experimento	Código	Rendimiento (mg)
Sedimento	01001-96-2	43.8
Sobrenadante	01001-96-3	55.6

De la fracción 01001-96-2 se aislaron 43.8 mg de duclauxina (**64**) como sólido color café. La estructura del producto se elucidó mediante técnicas espectroscópicas (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) y espectrométricas (EM-DART) y por comparación con los datos reportados en la literatura [137].

##### 6. 11. 2. Aislamiento de talaromycesona B (75)

El fraccionamiento secundario de la fracción 01001-139-11 se realizó mediante cromatografía en columna tipo flash, en un cromatógrafo CombiFlash Rf system (Teledyne ISCO., NE, EEUU), equipado con una bomba binaria y los detectores de arreglo de diodos (DAD) y evaporativo de dispersión de luz (ELSD). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (RediSep Rf) y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre diferentes mezclas de hexanos, CHCl<sub>3</sub> y MeOH (**Figura 17**). El procedimiento anterior generó 9 fracciones secundarias (**Tabla 9**).

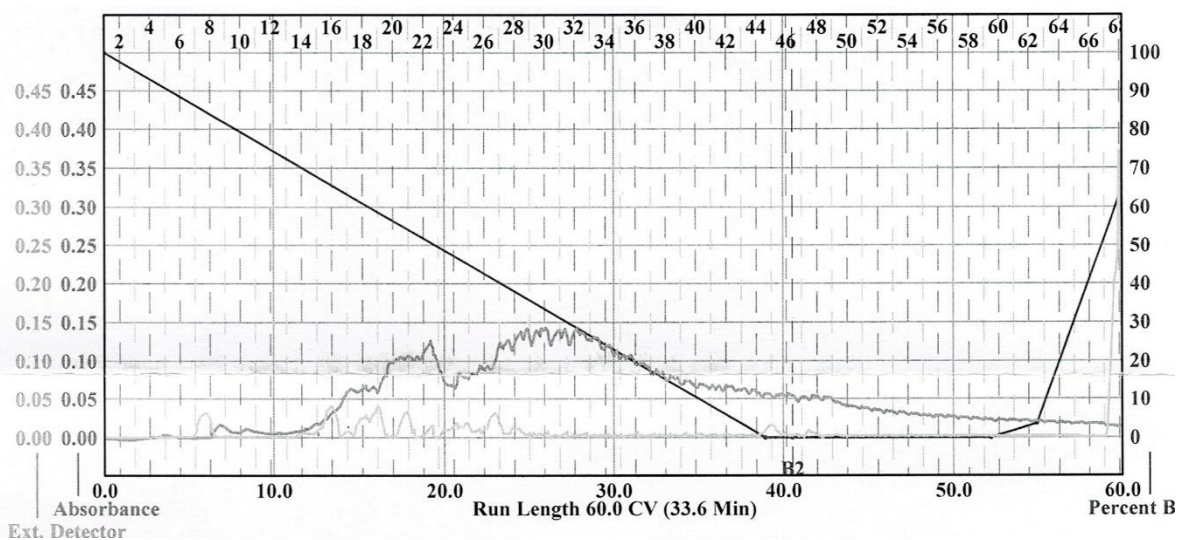


Figura 17. Cromatograma del extracto 01001-139-11.

Tabla 9. Agrupamiento de fracciones secundarias del extracto 01001-139-11.

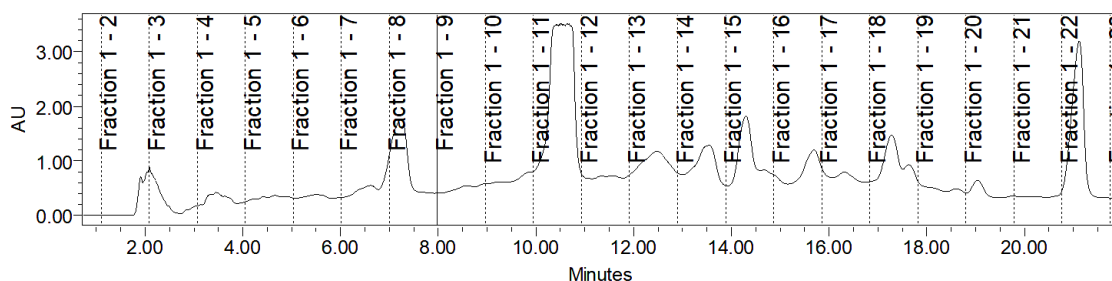
Grupo	Fracciones	Código	Rendimiento (mg)
1	1-9	01001-149-1	1.3
2	10-14	01001-149-2	2.9
3	15-16	01001-149-3	7.9
4	17-19	01001-149-4	22.2
5	20-21	01001-149-5	20.1
6	22-25	01001-149-6	35.5
7	26-43	01001-149-7	180.4
8	44-65	01001-149-8	54.3
9	66	01001-149-9	12.7

Se eligió la fracción secundaria 01001-149-7 (180.4 mg) para continuar el proceso de aislamiento y purificación. Se llevó a cabo un fraccionamiento por CCA utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria (CV = 95 mL) y MeOH como fase móvil. Cada fracción fue monitoreada vía CCF y aquellas con perfiles cromatográficos similares se agruparon en fracciones terciarias. El procedimiento anterior generó ocho fracciones terciarias (Tabla 10).

Tabla 10. Agrupamiento de fracciones terciarias del extracto 01001-149-7

Grupo	Fracciones	Código	Rendimiento (mg)
1	1-5	01002-05-1	51.7
2	6	01002-05-2	14.8
3	7	01002-05-3	19.3
4	8-12	01002-05-4	25.2
5	13	01002-05-5	5.7
6	14-15	01002-05-6	10.9
7	16-18	01002-05-7	31.7
8	19-24	01002-05-8	26.3
<b>Recuperado (%)</b>			<b>97 %</b>

Se seleccionó a la fracción 01002-05-4 (25.2 mg) para su posterior análisis por CLAE en modalidad semipreparativa. El análisis se realizó utilizando como fase móvil un gradiente lineal iniciando con 40% de MeCN (0.1 % ácido fórmico en agua) hasta 100% en 30 minutos, con un flujo de 4.6 mL/min (**Figura 18** y **Tabla 11**). El procedimiento anterior permitió el aislamiento de 6.0 mg de talaromycesona B (**75**) como un sólido cristalino. La estructura de este compuesto se elucidó mediante técnicas espectroscópicas (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) y espectrométricas (EM-DART) y por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura [96].



**Figura 18.** Cromatograma por CLAE del extracto 01002-05-4.

**Tabla 11.** Agrupamiento de fracciones del extracto 01002-05-4.

Grupo	Fracciones	Código	Rendimiento (mg)
1	2-3	01002-18-1	3.6
2	8	01002-18-2	1.0
3	11	01002-18-3	6.0
4	16	01002-18-4	1.2
5	21-22	01002-18-5	6.2

### 6. 11. 3. Aislamiento de xenoclauxina (76)

El fraccionamiento secundario de la fracción 01001-139-7 (800 mg) se realizó mediante cromatografía en columna tipo flash, en un cromatógrafo CombiFlash Rf. Como fase estacionaria se empleó una columna C18 (RediSep Rf, 130g) y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre diferentes mezclas de MeOH y agua a 50 mL/min. (**Figura 19**). El procedimiento anterior generó 13 fracciones terciarias (**Tabla 12**).

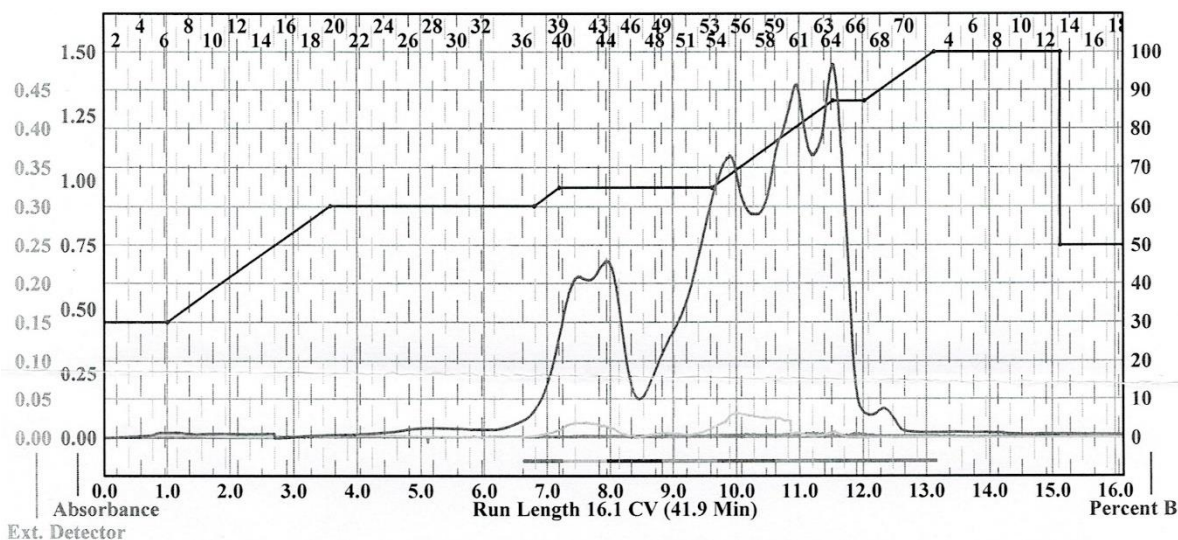


Figura 19. Cromatograma del extracto 01001-139-7.

Tabla 12. Agrupamiento de las fracciones secundarias del extracto 01001-139-7.

Grupo	Fracciones	Código	Rendimiento (mg)
1	20-29	01001-150-1	9.7
2	30-34	01001-150-2	7.9
3	35-39	01001-150-3	12.3
4	40-41	01001-150-4	38.3
5	42	01001-150-5	19.9
6	43-46	01001-150-6	57.8
7	47-48	01001-150-7	24.1
8	49-55	01001-150-8	180.1
9	56-57	01001-150-9	80.5
10	58-60	01001-150-10	126.8
11	61-62	01001-150-11	86.8
12	63-66	01001-150-12	99.8
13	67-69	01001-150-13	11.1

De la fracción 01001-150-13 se aislaron 11.1 mg de xenoclauxina (**76**) como un sólido color marrón. La estructura de este compuesto se elucidó mediante técnicas espectroscópicas (RMN-1H y RMN-13C) y espectrométricas (EM-DART) y por comparación de los datos espectroscópicos con aquellos reportados en la literatura [138].

#### 6. 11. 4. Aislamiento de bacillisporina G (**77**)

El aislamiento y purificación de los componentes presentes en la fracción primaria de 01001-139-7 (80 mg) mediante CLAE en modo semipreparativo (20.0 mL/min, **Figura 20**) condujo al aislamiento de 9.3 mg de bacillisporina G (**77**) como un sólido color amarillo opaco (**Tabla 13**). La estructura de este compuesto se elucidó mediante técnicas espectroscópicas (RMN-1H y RMN-13C) y espectrométricas (EM-DART) y por comparación de los datos espectroscópicos con aquellos reportados en la literatura [111].

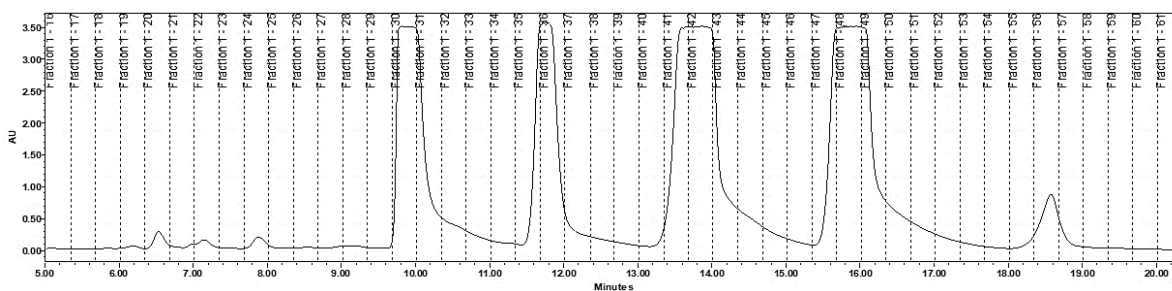


Figura 20. Cromatograma por CLAE del extracto 01001-139-7.

Tabla 13. Agrupamiento de fracciones del extracto 01001-139-7.

Grupo	Fracciones	Código	Rendimiento (mg)
1	20-25	01001-140-1	2.7
2	31-33	01001-140-2	13.1
3	35-38	01001-140-3	9.6
4	43-45	01001-140-4	24.1
5	50-51	01001-140-5	21.1
6	59	01001-140-6	2.0

## 6. 12. Evaluación del efecto inhibitorio de los compuestos aislados sobre la actividad de la *hPTP1B*<sub>1-400</sub>

La actividad biológica de la duclauxina (**64**), la xenoclauxina (**76**), la talaromycesona B (**75**) y la bacillisporina G (**77**) como inhibidores de la enzima *hPTP1B*<sub>1-400</sub> se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 6. 8. Los compuestos **64**, **76**, y **77** se evaluaron en un rango de concentración de 0-60  $\mu\text{M}$ , mientras que el compuesto **75** se evaluó en un rango de concentración de 0-300  $\mu\text{M}$ . El control positivo ácido ursólico (**74**) se evaluó en una concentración de 0-100  $\mu\text{M}$ . Con los resultados obtenidos se calculó la  $\text{CI}_{50}$  de cada compuesto mediante un análisis de regresión no lineal con ajuste de Hill.

## 6. 13. Caracterización de la inhibición enzimática de la duclauxina (**64**) y el ácido ursólico (**74**) sobre la *hPTP1B*<sub>1-400</sub>

El tipo de inhibición enzimática de la duclauxina (**64**) y el ácido ursólico (**74**) sobre la *hPTP1B*<sub>1-400</sub> se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.8, para ello se elaboraron curvas de saturación por sustrato (0.5-10 mM) a diferentes concentraciones de inhibidor. El tipo de inhibición de los productos se realizó mediante análisis gráfico. El valor de las constantes de inhibición se calculó a través de un análisis de regresión no lineal utilizando la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{max}S}{k_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i}\right) + S \left(1 + \frac{[I]}{\alpha k_i}\right)}$$

Donde  $v$  es la velocidad inicial en presencia y ausencia de inhibidor,  $S$  e  $I$  son las concentraciones de sustrato e inhibidor,  $V_{max}$  es la velocidad máxima,  $k_m$  es la constante de Michaelis-Menten,  $k_i$  es la constante de inhibición competitiva y  $\alpha k_i$  es la constante de inhibición no competitiva.



Con los resultados obtenidos a partir de estos experimentos se calculó la constante de inhibición ( $k_i$ ) experimental y el tipo de inhibición mediante regresiones no lineales utilizando el software de GraphPad Prism 6.0.

## 6. 14. Estudios de acoplamiento molecular

### 6. 14. 1. Validación

Para la validación del método de acoplamiento molecular se utilizó la proteína PDB ID: 1SUG y la estructura del sustrato (*p*-NPP) construida en el software ChemBioDraw Ultra 13.0 y minimizada en el programa Spartan<sup>10</sup> con un campo de fuerza semiempírico PM3. Los parámetros empleados para el estudio de validación fueron idénticos a los empleados con los ligandos evaluados duclauxina (**64**), talaromycesona B (**75**), xenoclauxina (**76**), bacillisporina G (**77**) y ácido ursólico (**74**). Los resultados de la validación (**Figura 52**) muestran que el *p*-NPP se une en el sitio catalítico de la enzima, validando los resultados obtenidos de las simulaciones. Cabe destacar que la validación se realizó con el sustrato de la enzima ya que no existen ligantes co-cristalizados con la estructura 1SUG.

### 6. 14. 2. Enzima

La estructura de la *h*PTP1B<sub>1-300</sub> co-cristalizada con glicerol y buffer Tris se obtuvo del *Protein Data Bank* (PDB ID: 1SUG). Se seleccionó esta estructura debido a su alta resolución y que posee un mayor número de aminoácidos (1-300). La estructura proteica usada en los cálculos de acoplamiento molecular se preparó en la interfaz gráfica AutoDock Tools 1.5.6 (ADT), en la cual se añadieron los átomos de hidrógeno polares y cargas de Kolleman. Los archivos fueron almacenados en un formato apropiado (.pdb) para su posterior uso en Autogrid 4.0 y Autodock 4.0.

### 6. 14. 3. Preparación de los ligandos

Los ligandos evaluados en los estudios de acoplamiento molecular se construyeron en el programa Spartan<sup>10</sup> ([www.wavefunction.com](http://www.wavefunction.com)). La optimización geométrica se realizó usando métodos semiempíricos, con un campo de fuerza PM3, en el mismo software. Posteriormente los ligandos fueron preparados con la asignación de las cargas atómicas de Gasteiger-Marsilli y la adición de hidrógenos no polares mediante el programa Autodock 4.0 usando la interfaz ADT 1.5.6.

### 6. 14. 4. Acoplamiento molecular (AM)

La predicción de las conformaciones accesibles por los ligandos se realizó con el programa Autodock 4.0 (<http://autodock.scripps.edu/>) empleando un Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA). Para la predicción de los sitios y conformaciones de unión de menor energía se realizó un estudio de acoplamiento molecular ciego en una región de búsqueda (*grid*) de 126 x 126 x 126 Å centrada en la proteína. Se realizó un *docking* ciego y no en el sitio catalítico de la enzima porque se pretendía encontrar sitios de unión alostéricos, ya que a pesar del potencial terapéutico de la PTP1B es difícil encontrar inhibidores selectivos de ésta, principalmente debido a su homología estructural con otras PTPs como la PTP de células T (TCPTP; 80% de homología) [135]. Todas las simulaciones se realizaron con un LGA y 100 corridas. Los resultados fueron analizados utilizando la interfaz ADT 1.5.6 (análisis por agrupamiento) y PyMOL 2.3.2.

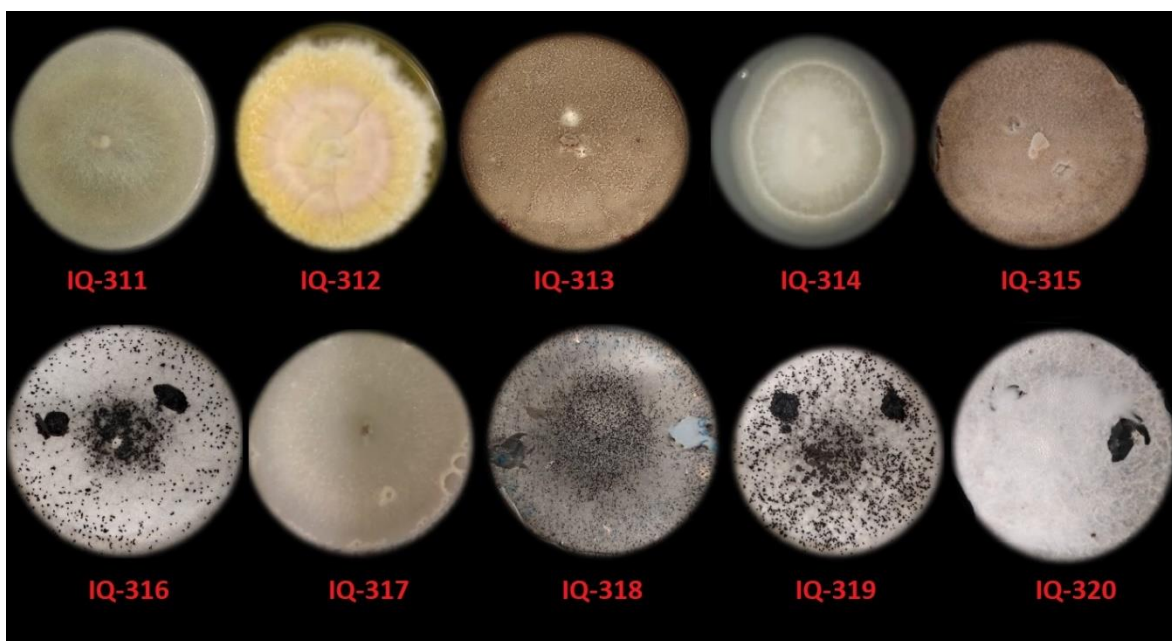
## 7. Resultados y discusión

### 7. 1. Aislamiento y cultivo de microorganismos fúngicos

A partir de las muestras de tierra de hormiguero recolectadas se aislaron un total de 10 microorganismos fúngicos (**Tabla 14**) con características morfológicas distintas (**Figura 21**).

**Tabla 14.** Microorganismos aislados y código asignado.

Procedencia del microorganismo	Número de microorganismo aislado	Código
Tierra de hormiguero	1	IQ-311
	2	IQ-312
	3	IQ-313
	4	IQ-314
	5	IQ-315
	6	IQ-316
	7	IQ-317
	8	IQ-318
	9	IQ-319
	10	IQ-320

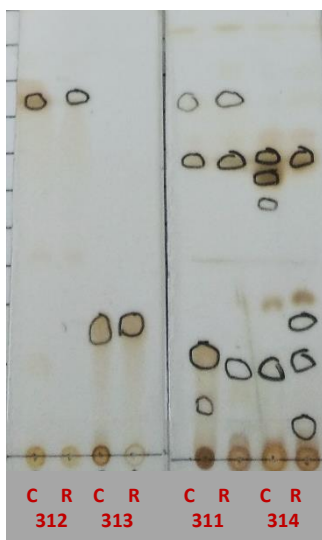


**Figura 21.** Microorganismos fúngicos aislados en la región de Xochiatipan en la Huasteca Hidalguense.

Los cultivos axénicos muestran una gran variedad, fortaleciendo la hipótesis de que en zonas poco exploradas de México hay gran diversidad de especies fúngicas, en particular los hormigueros son una fuente rica de estos microorganismos debido a las asociaciones simbióticas que ahí se establecen [136]. Con estos hallazgos se contribuye a la generación de conocimiento sobre la diversidad de especies fúngicas del estado de Hidalgo y de los hormigueros como nichos ecológicos.

## 7. 2. Obtención de los extractos orgánicos

Se seleccionaron los hongos del IQ-311 al IQ-314 para la obtención y posterior análisis de los extractos orgánicos, de dichos extractos se obtuvieron rendimientos entre 34 y 950 mg aproximadamente (**Tabla 6**). En el análisis por CCF se observaron diferencias en los perfiles químicos (**Figura 22**), mostrando la diversidad metabólica entre los microorganismos estudiados.



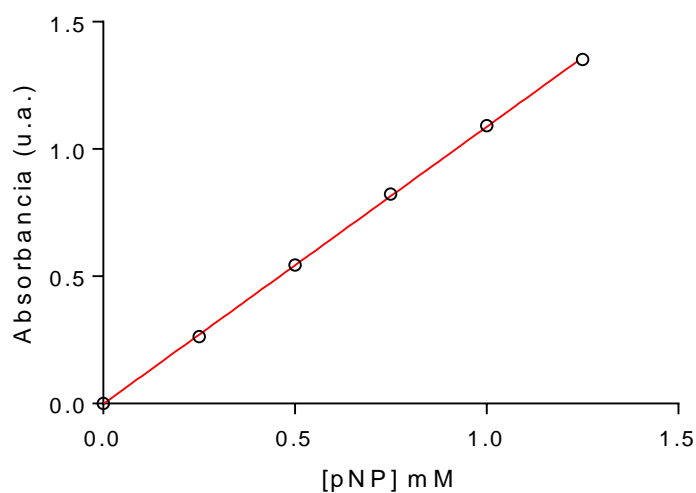
**Figura 22.** Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos orgánicos con sistema de elución AcOEt:hex 30:70. C, Cheerios®; R, Arroz.

Cada microorganismo se cultivó en dos medios diferentes con la finalidad de analizar el impacto del medio de crecimiento en la producción de metabolitos [64]. Sin embargo, los perfiles metabólicos de IQ-312 y de IQ-313 no presentaron diferencias significativas entre un medio y otro. Los perfiles metabólicos de IQ-311 y de IQ-314 cualitativamente mostraron un aumento en la producción de metabolitos en el medio de Cheerios®.

## 7. 3. Establecimiento de un método enzimático con la *hPTP1B*<sub>1-400</sub> para la búsqueda de compuestos de origen fúngico con potencial hipoglucemiante y antitumoral

### 7. 3. 1. Curva patrón de *p*-NP

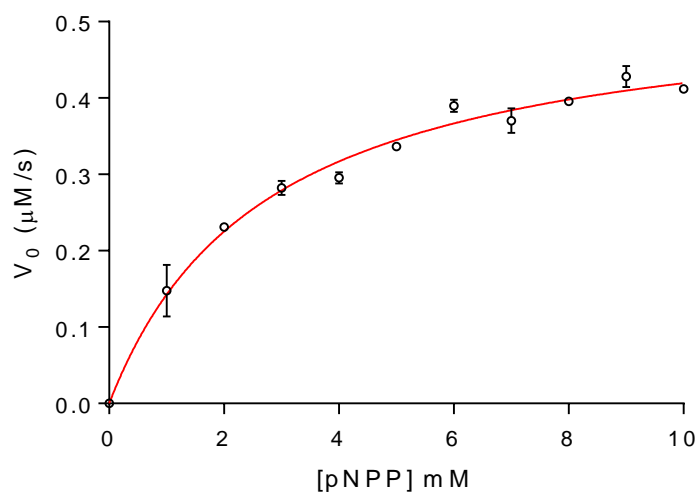
Se construyó la curva patrón (**Figura 23**) del *p*-NP, producto de la reacción enzimática de hidrólisis, para posteriormente calcular la velocidad de reacción útil en los siguientes ensayos. Se obtuvo la siguiente ecuación:  $Abs = 1.089[p\text{-NP}] - 0.001410$ .



**Figura 23.** Curva patrón del *p*-NP.

### 7. 3. 2. Curva de saturación por sustrato *p*-NPP

El estado de saturación de la enzima PTP1B se logró utilizando un rango de concentración de 1.0-10 mM (**Figura 24**). Con los datos obtenidos se calculó la velocidad máxima y la constante de Michaelis ( $K_m$ ), 0.5350 mM/min y 2.755 mM respectivamente, mediante un análisis de regresión no lineal. Con este ensayo se estableció la concentración de sustrato para los ensayos de inhibición. Dicha concentración fue el valor de la  $K_m$ .



**Figura 24.** Curva de saturación por sustrato *p*-NPP.

### 7. 3. 3. Curva de inhibición con ácido ursólico (74)

La curva de inhibición con el compuesto **74** se realizó para conocer la concentración a emplear como control positivo. Se valió en un rango de concentración de 0.0-100 µM. El porcentaje de inhibición alcanzado fue de 89% a la concentración más alta (**Figura 25**) y la  $CI_{50}$  fue de 27 µM, calculada

mediante un análisis de regresión no lineal con ajuste de Hill. Dicha concentración se utilizó para los ensayos de inhibición del extracto y los compuestos aislados.

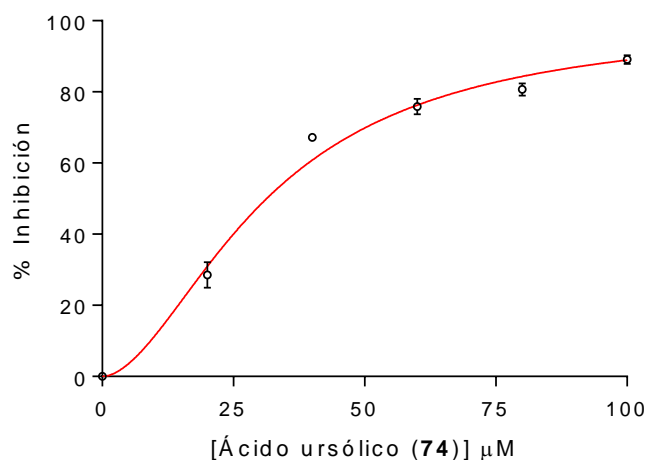


Figura 25. Curva de inhibición con ácido ursólico (74).

#### 7. 4. Ensayo de inhibición de la *hPTP1B*<sub>1-400</sub> del extracto original de IQ-313

La obtención y el estudio de los extractos orgánicos como inhibidores de la *hPTP1B*<sub>1-400</sub> se llevó a cabo con el objetivo de buscar posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades de alta incidencia poblacional como la DMTII y el cáncer, ya que a pesar de las medidas que se han tomado para comprender y controlar su incidencia, ésta sigue en aumento [11]. Por tal motivo los extractos orgánicos de los medios de cultivo Cheerios® y arroz del hongo IQ-313 se evaluaron como inhibidores de la enzima *hPTP1B*<sub>1-400</sub> utilizando el protocolo desarrollado y descrito en el apartado 6.8. Los resultados indicaron que el extracto de Cheerios® tuvo una inhibición mayor que la del extracto de arroz, con un porcentaje de ~80% (Figura 26). Tomando en cuenta los resultados anteriores, se seleccionó este extracto para aislar los compuestos responsables de la inhibición enzimática.

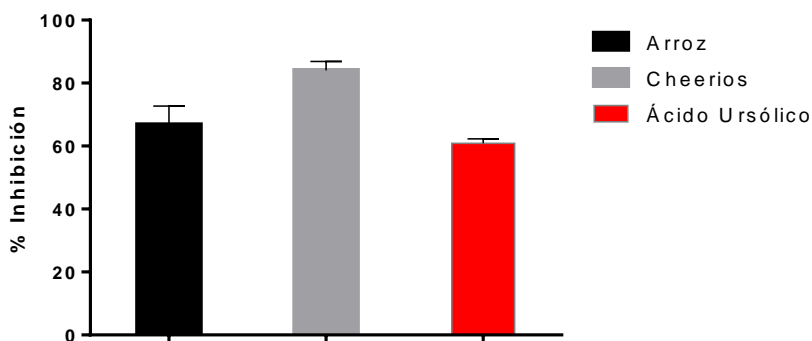
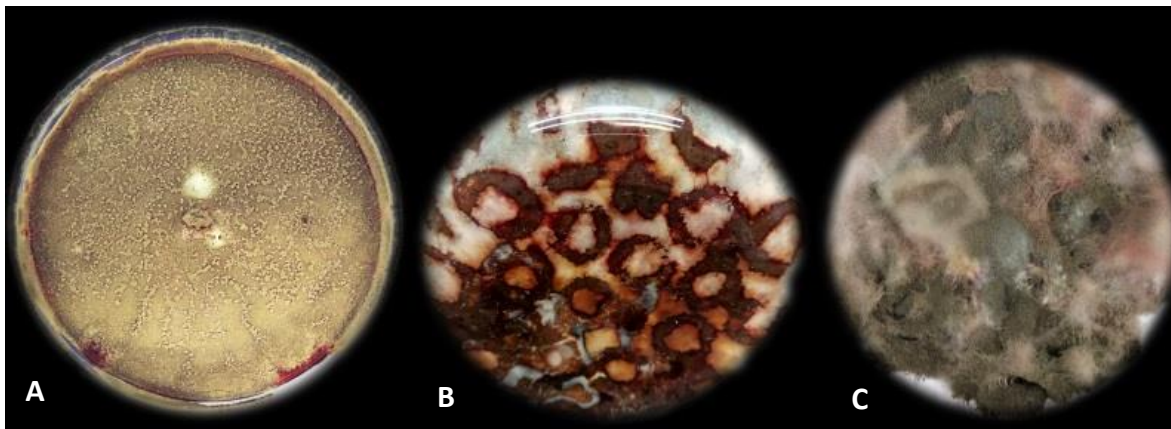


Figura 26. Porcentaje de inhibición sobre la PTP1B del extracto original y el control positivo (74).

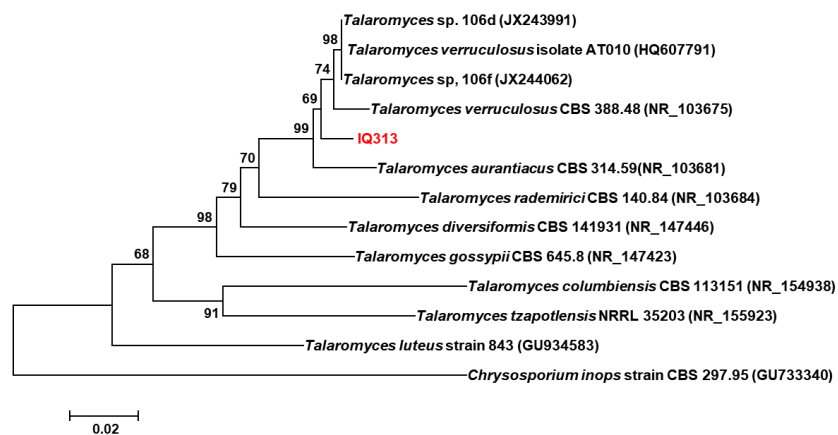
## 7. 5. Identificación taxonómica del microorganismo seleccionado

Considerando los resultados de rendimiento, el perfil cromatográfico por CCF y la actividad inhibitoria sobre la *hPTP1B*<sub>1-400</sub> del aislamiento del IQ-313 (**Figura 27**), se seleccionó este microorganismo para realizar su estudio químico e identificación taxonómica.



**Figura 27.** Microorganismo fúngico seleccionado IQ-313. (A) crecimiento en caja de Petri con PDA (aislamiento); (B) crecimiento de aproximadamente 30 día en Cheerios® (reverso); (C) crecimiento de aproximadamente 30 días en Cheerios® (frente).

El microorganismo IQ-313 se identificó como *Talaromyces* sp. (**Figura 28**). El árbol filogenético fue obtenido mediante secuenciación molecular de la región ITS y análisis de homología tipo BLAST utilizando la base de datos del NCBI. Sin embargo, no se logró identificar la especie debido a que se necesitan otros marcadores moleculares específicos para el género, como  $\beta$ -tubulina o RNA pol II (RPB2).



**Figura 28.** Árbol filogenético del microorganismo fúngico IQ-313.

## 7. 6. Estudio químico del extracto seleccionado de la especie *Talaromyces* sp. (IQ-313)

El extracto orgánico del medio de cultivo de Cheerios® (01001-94-5) de aproximadamente 4 g se sometió a una serie de fraccionamientos para conseguir el aislamiento de la duclauxina (**64**), la talaromycesona B (**75**), la xenoclauxina (**76**) y la bacillisporina G (**77**), todos compuestos de tipo fenalenona. Posteriormente se realizó la elucidación de la estructura de cada compuesto.

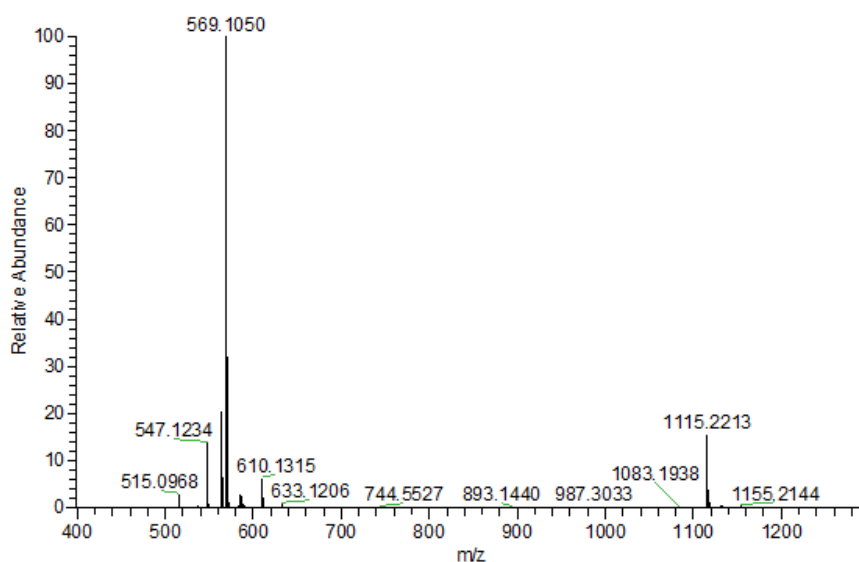
### 7. 6. 1. Aislamiento y elucidación estructural de duclauxina (64), talaromycesona B (75), xenoclauxina (76) y bacillisporina G (77)

Se tomaron 100 mg de extracto del medio de cultivo de Cheerios® (01001-94-5) del hongo IQ-313 y se fraccionó por precipitación con MeOH y centrifugación. Se obtuvieron 2 fracciones que tuvieron rendimientos entre 40 y 56 mg aproximadamente (**Tabla 8**). En el análisis por CCF se observaron diferencias en los perfiles químicos de los extractos (**Figura 29**).



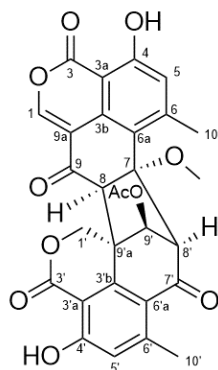
**Figura 29.** Cromatografía en capa fina (CCF) del extracto 01001-94-5 con sistema de elución AcOEt:Hex 1:1. Se, sedimento; So, sobrenadante.

De la fracción del sedimento (01001-96-2) se aislaron 43.8 mg de duclauxina (**64**) como sólido color café claro soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Su fórmula y masa molecular se estableció como  $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  y 546.1156 una respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por electro spray en modo positivo (HRESI-MS) (**Figura 30**). Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se muestran en la **Tabla 15** y son congruentes con los reportados en la literatura [137].



**Figura 30.** Espectro de masas de alta resolución por electro spray en modo positivo (ESI-MS) para la duclauxina (64).

En el espectro de masas del compuesto **64** se observa el pico de 569 m/z que representa la masa molecular de la duclauxina (546 uma) más la masa atómica del sodio (23 uma); así mismo el pico de 1115 m/z representa el aducto formado entre dos moléculas de duclauxina y un átomo de sodio.



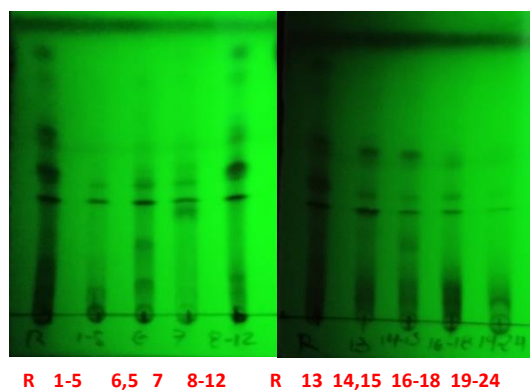
Duclauxina (**64**)

**Tabla 15.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de la duclauxina (**64**) en CDCl<sub>3</sub>.

#	Posición	$\delta_c$ en ppm	$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)
1	1	148.5	7.71, s
2	3	164.0	
3	3a	101.5	
4	3b	133.0	
5	4	161.9	
6	5	121.5	6.64, s
7	6	152.1	
8	6a	118.4	
9	7	88.9	
10	8	64.2	3.98, s
11	9	193.8	
12	9a	113.4	
13	10	22.8	2.11, s
14	1'	71.5	5.09, d (12.24); 4.77, d (12.24)
15	3'	167.4	
16	3'a	104.9	
17	3'b	143.0	
18	4'	164.9	
19	5'	121.1	6.91, s
20	6'	152.1	
21	6'a	120.9	
22	7'	191.0	
23	8'	67.5	4.14, s
24	9'	78.9	5.20, s
25	9'a	51.2	
26	10'	22.4	2.74, s
27	CH <sub>3</sub> COO-	21.1	2.22, s
28	CH <sub>3</sub> COO-	169.7	
29	7-OMe	51.9	2.97, s
30	4-OH		10.66, s
31	4'-OH		11.71, s

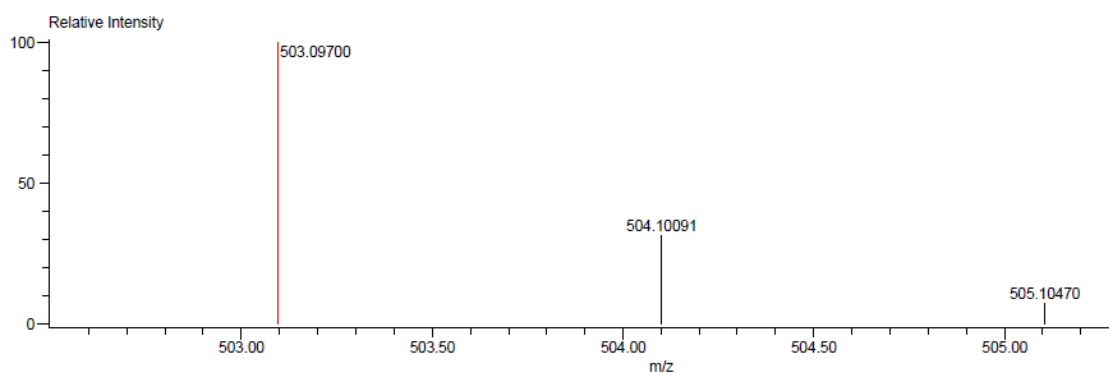


Con la finalidad de obtener los metabolitos presentes en el extracto orgánico de IQ-313 cultivado en Cheerios®, se realizó el escalamiento del cultivo (pequeña escala × 5). El extracto orgánico obtenido (01001-94-5, 4 g) se sometió a un fraccionamiento primario por CCA en sílica gel de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 6.10. Este procedimiento permitió la obtención de 12 fracciones primarias (**Tabla 7**), de las cuales la fracción 01001-139-11 (450 mg) se fraccionó por cromatografía tipo flash en fase normal como se describe en la sección 6.11.2. De ese procedimiento se obtuvieron 9 fracciones secundarias (**Tabla 9**). Se eligió la fracción secundaria 01001-149-7 (190.4 mg) para continuar el proceso de purificación. Se llevó a cabo un tercer fraccionamiento por CCA con Sephadex LH-20 y cada fracción fue monitoreada vía CCF y aquellas con patrones cromatográficos similares se agruparon para generar 8 fracciones terciarias (**Tabla 10**) a las que se les realizó CCF para visualizar sus perfiles cromatográficos (**Figura 31**).

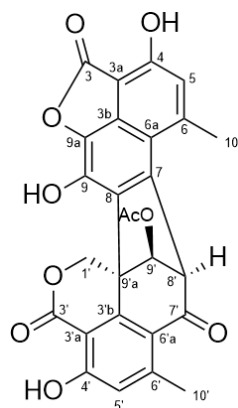


**Figura 31.** Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones agrupadas de 01001-149-7 con sistema de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  95:5. La fracción agrupada 8-12 se renombró 01002-05-4.

Se escogió la fracción 01002-05-4 (24 mg) para seguir con el proceso de aislamiento, para lo cual se llevó a cabo un cuarto fraccionamiento CLAE que generó 5 fracciones (**Tabla 11**). La fracción 01002-18-3 (6.0 mg), un sólido cristalino color amarillo claro soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se caracterizó como talaromycesona B (**75**). Su fórmula y masa molecular se estableció como  $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$  y 502.089 una respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización química utilizando la técnica de análisis directo en tiempo real (DART-MS) (**Figura 32**). Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  y  $\text{RMN}^{-13}\text{C}$  se muestran en la **Tabla 16** y son congruentes con los reportados en la literatura [96].



**Figura 32.** Espectro de masas de alta resolución por DART de la talaromycesona B (**75**).

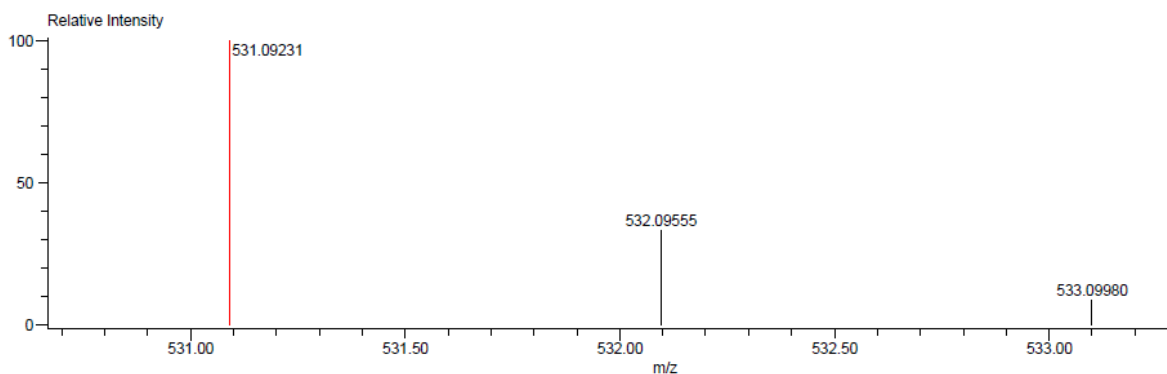


Talaromycesona B (**75**)

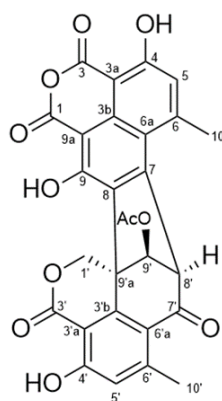
**Tabla 16.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de la talaromycesona B (**75**) en CDCl<sub>3</sub>.

#	Posición	$\delta_c$ en ppm	$\delta_H$ en ppm, mult. (J en Hz)
1	3	167.7	
2	3a	99.7	
3	3b	132.3	
4	4	160.7	
5	5	121.3	6.92, s
6	6	146.2	
7	6a	116.9	
8	7	131.4	
9	8	135.2	
10	9	134.2	
11	9a	136.8	
12	10	23.9	2.59, s
13	1'	69.2	5.17, d (12.4); 4.94, d (12.4)
14	3'	168.9	
15	3'a	103.3	
16	3'b	148.0	
17	4'	164.6	
18	5'	120.6	6.79, s
19	6'	154.1	
20	6'a	117.5	
21	7'	190.3	
22	8'	60.8	4.77, s
23	9'	86.4	5.88, s
24	9'a	49.4	
25	10'	22.6	2.98, s
26	CH <sub>3</sub> COO-	20.9	2.07, s
27	CH <sub>3</sub> COO-	170.2	
28	9-OH		11.80, s

De las 12 fracciones primarias del extracto 01001-94-5 (**Tabla 7**) se eligió la fracción 01001-139-7 (750 mg) y se fraccionó por CLAE como se describe en la sección 6.11.3. De ese procedimiento se obtuvieron 13 fracciones secundarias (**Tabla 12**). De la fracción 01001-150-13 se aislaron 11.1 mg de xenoclauxina (**76**) como un sólido color marrón claro soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Su fórmula y masa molecular se estableció como C<sub>28</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub> y 530.084 uma respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización química utilizando la técnica de DART-MS (**Figura 33**). Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se muestran en la **Tabla 17** y son congruentes con los reportados en la literatura [138].



**Figura 33.** Espectro de masas de alta resolución por DART de la xenoclauxina (**76**).

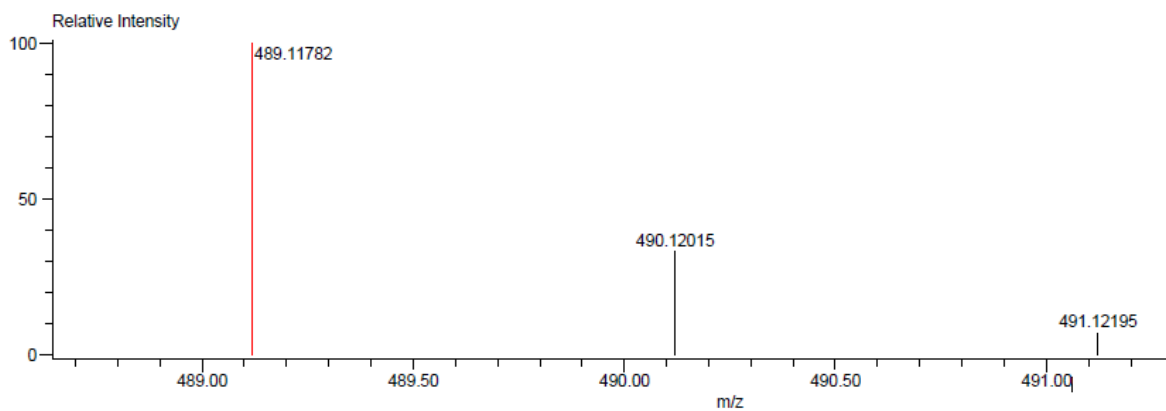


Xenoclauxina (**76**)

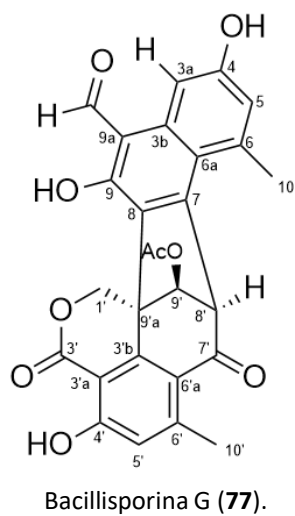
**Tabla 17.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de la xenoclauxina (**76**) en CDCl<sub>3</sub>.

#	Posición	δ <sub>C</sub> en ppm	δ <sub>H</sub> en ppm, mult. (J en Hz)
1	1	164.6	
2	3	167.5	
3	3a	100.1	
4	3b	103.7	
5	4	164.9	
6	5	121.8	7.05, s
7	6	145.5	
8	6a	116.5	
9	7	131.9	
10	8	134.9	
11	9	149.6	
12	9a	161.4	
13	10	25.6	3.10, s
14	1'	68.6	5.18, d (12.47); 4.94, d (12.47)
15	3'	166.4	
16	3'a	97.5	
17	3'b	148.7	
18	4'	165.2	
19	5'	120.9	6.82, s
20	6'	154.2	
21	6'a	118.5	
22	7'	189.0	
23	8'	62.9	5.34, s
24	9'	85.7	5.86, s
25	9'a	48.4	
26	10'	24.0	2.57, s
27	CH <sub>3</sub> COO-	20.9	2.07, s
28	CH <sub>3</sub> COO-	170.1	
29	4-OH		11.98, s

De las 12 fracciones primarias del extracto 01001-94-5 (**Tabla 7**) se eligió la fracción 01001-139-7 (200 mg) y se fraccionó por CLAE como se describe en la sección 6.11.4. De ese procedimiento se obtuvieron 6 fracciones secundarias (**Tabla 13**). De la fracción 01001-140-3 se aislaron 9.6 mg de bacillisporina G (**77**) como un sólido color amarillo opaco soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Su fórmula y masa molecular se estableció como C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> y 488.110 uma respectivamente, con base en los resultados del análisis de espectrometría de masas por ionización química utilizando la técnica de DART-MS (**Figura 34**). Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se muestran en la **Tabla 18** y son congruentes con lo reportado en la literatura [111].



**Figura 34.** Espectro de masas de alta resolución por DART de la bacillisporina G (**77**).

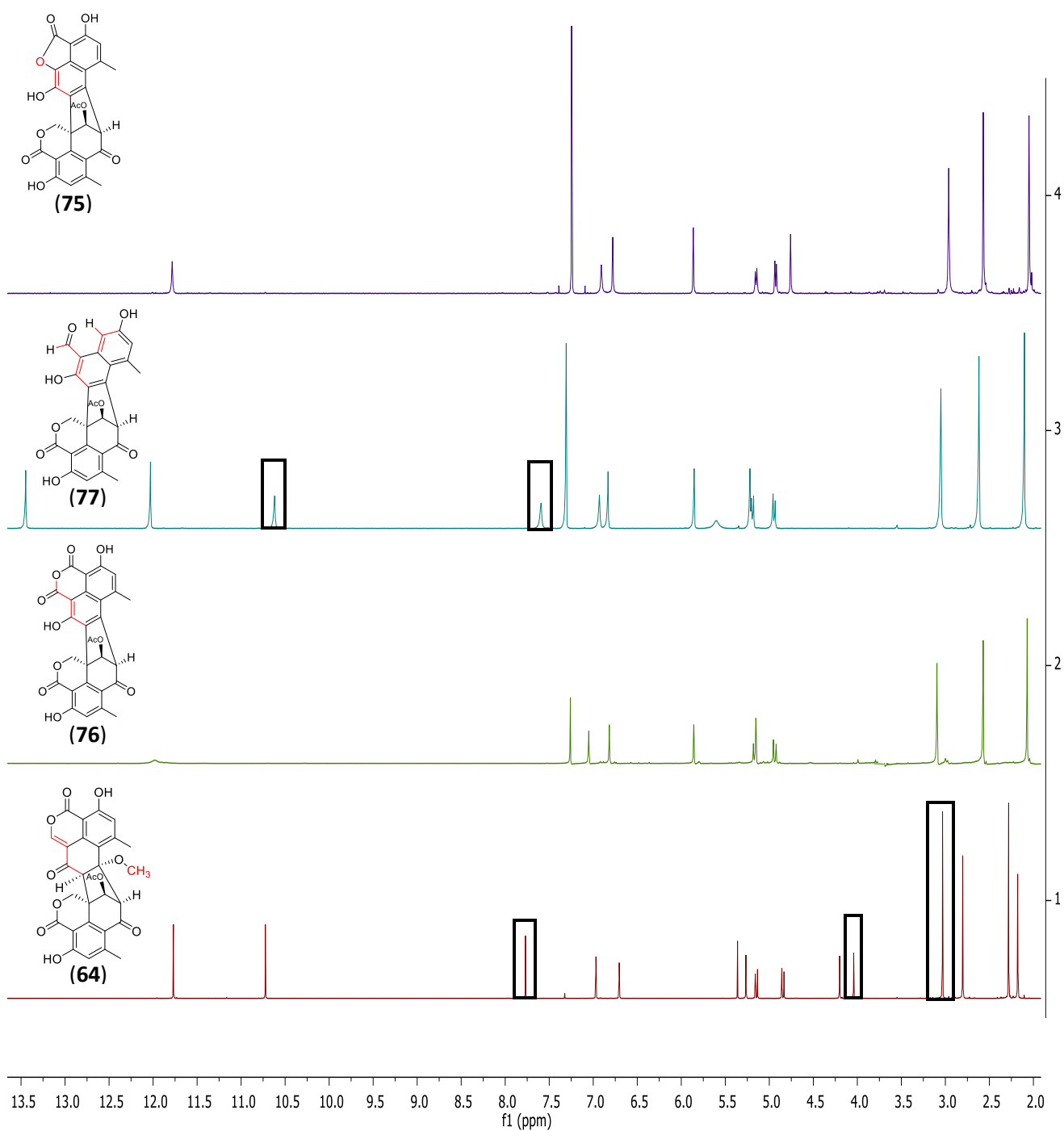


**Tabla 18.** Datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) de la bacillisporina G (**77**) en CDCl<sub>3</sub>.

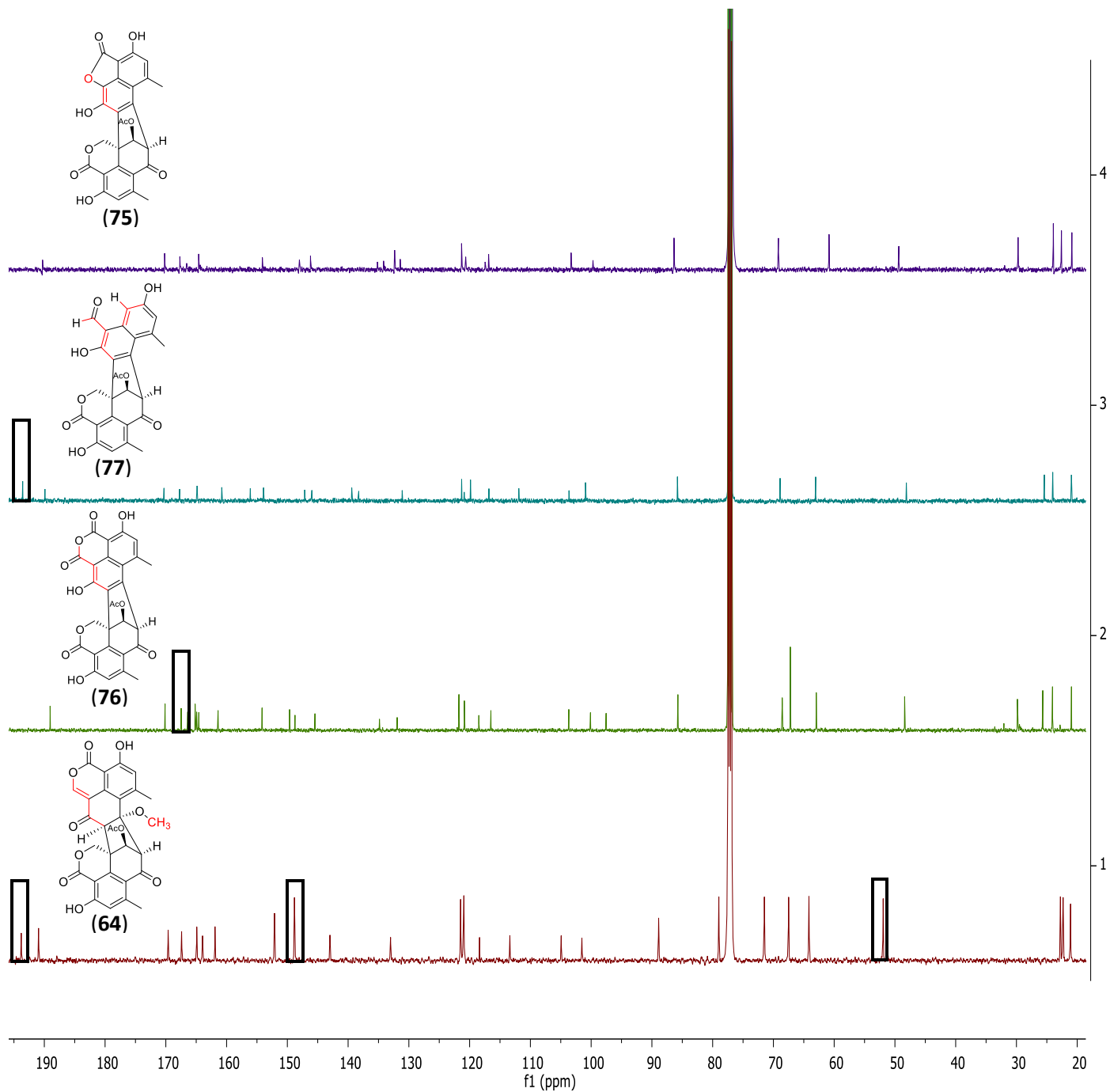
#	Posición	δ <sub>C</sub> en ppm	δ <sub>H</sub> en ppm, mult. (J en Hz)
1	3a	100.9	7.55, s
2	3b	138.3	
3	4	156.1	
4	5	119.9	6.88, s
5	6	139.4	
6	6a	120.9	
7	7	147.2	
8	8	131.1	
9	9	160.8	
10	9a	111.9	
11	10	25.4	3.00, s
12	1'	68.9	5.14, d (12.3); 4.91, d (12.3)
13	3'	167.7	
14	3'a	103.6	
15	3'b	146.0	
16	4'	164.9	
17	5'	121.3	6.78, s
18	6'	153.9	
19	6'a	116.8	
20	7'	189.9	
21	8'	63.1	5.17, s
22	9'	85.8	5.81, s
23	9'a	48.1	
24	10'	24.0	2.57, s
25	HCO	193.6	10.57, s
26	CH <sub>3</sub> COO-	21.0	2.05, s
27	CH <sub>3</sub> COO-	170.3	
28	4-OH		13.41, s
29	9-OH		11.98, s

Los cuatro compuestos son muy similares en su estructura, todos comparten los tres anillos de la unidad base inferior, teniendo cambios en los anillos superiores (unidad principal). Se apilaron los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (700 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (175 MHz) en CDCl<sub>3</sub> para observar las señales que comparten.

En la **Figura 35** y la **Figura 36** se observan las señales de protones y carbonos que son diferentes en los compuestos.



**Figura 35.** Espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) apilados de duclauxina (**64**), talaromycesona B (**75**), xenoclauxina (**76**) y bacillisporina G (**77**).



**Figura 36.** Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) apilados de duclauxina (**64**), talaromycesona B (**75**), xenoclauxina (**76**) y bacillisporina G (**77**).



Para el compuesto **64** en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se ven tres señales distintas: una en 2.97 ppm perteneciente al hidrógeno del metoxilo, otra en 3.98 ppm perteneciente al metino en C-8, y en 7.71 ppm perteneciente al hidrógeno aromático en C-1. En cuanto a las señales que son similares en los cuatro compuestos se observaron: dos dobletes en  $\delta_H$  5.09 y 4.77 ( $J = 12.2$  Hz) correspondientes a los hidrógenos disterotópicos del metileno en C-1' (H-1'), dos singuletes de metilo en 2.12 y 2.74 ppm contiguos a los protones aromáticos en 6.64 y 6.91 ppm. El singulete en 2.22 ppm se atribuye al grupo acetilo del C-9'. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C presenta señales para 29 carbonos, siendo congruente con la fórmula molecular establecida para este compuesto. Para la unidad base se observaron cuatro señales en el rango de 150 a 220 ppm pertenecientes a dos carbonilos (C-3' y C-7'), a un fenol en C-4' y a un carbono olefínico en C-6', cuatro señales en el rango de 100 a 150 ppm pertenecientes a cuatro carbonos aromáticos (C-3'a, C-3'b, C-6'a y C-5'), cuatro señales en el rango de 50 a 100 ppm pertenecientes a dos carbonos unidos a oxígenos (C-1' y C-9') y a dos carbonos sp<sup>3</sup> moderadamente desprotegidos por su cercanía a dobles enlaces y oxígenos (C-9'a y C-8'), y por último una señal en el rango de 0 a 50 ppm perteneciente a un carbono de metilo (C-10'). Para la unidad principal se observaron cuatro señales en el rango de 150 a 220 ppm pertenecientes a dos carbonilos (C-3 y C-9), a un fenol en C-4 y a un carbono olefínico en C-6, seis señales en el rango de 100 a 150 ppm pertenecientes a carbonos aromáticos (C-1, C-3a, C-3b, C-6a, C-9a y C-5), tres señales en el rango de 50 a 100 ppm pertenecientes a dos carbonos unidos a oxígenos (C-7 y OMe) y a un carbonos sp<sup>3</sup> moderadamente desprotegido por su cercanía a dobles enlaces y oxígenos (C-8), y por último una señal en el rango de 0 a 50 ppm perteneciente a un carbono metilo (C-10).

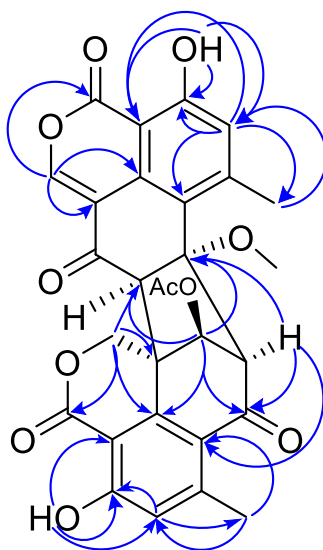
Para el compuesto **75** en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observa que la señal del hidrógeno del C-1 se pierde y además se ve una señal de hidrógeno perteneciente al fenol del C-9 en 11.80 ppm, también se pierden las señales para los fenoles en C-4 y C-4'. En cuanto a las señales similares se observaron los dos dobletes correspondientes a dos hidrógenos metilenos de la posición C-1' en  $\delta_H$  5.17 y 4.94 ( $J = 12.4$  Hz), dos singuletes de metilo (2.98 y 2.59 ppm) adyacentes a los protones aromáticos en 6.92 y 6.79 ppm, y el singulete en 2.07 ppm que se atribuye al grupo acetilo del C-9'. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C presenta señales para 27 carbonos, siendo congruente con la fórmula molecular establecida. Los desplazamientos químicos de 15 carbonos mostraron concordancia con los carbonos de la unidad base de la duclauxina (**64**) con el grupo acetilo en el C-9'. Las 12 señales de carbono restantes no pudieron construir un esqueleto completo de monómero de oxafenalenona, por lo que un análisis detallado de los datos de RMN permitió la asignación completa de la cadena principal de naftaleno con un grupo metilo en C-6 y dos grupos hidroxilo en C-4 y C-9. Por lo tanto, estaba implícito que C-1 o C-3 estaba ausente y el anillo de piranona se transformaría en un anillo de furanona. El desplazamiento químico del C-3a fue de 99.7 ppm, que se debe al efecto de desprotección del carbonilo, mientras que el desplazamiento químico del C-9a en el espectro RMN-<sup>13</sup>C fue a 136.8 ppm, una resonancia típica de un carbono unido a un oxígeno, lo que indica que el C-1 estaba ausente en este compuesto. Esta deducción fue confirmada por una correlación HMBC de la señal de protones aromáticos en  $\delta_H$  6.92 (H-5) a la señal de carbono aromático en  $\delta_C$  99.7 (C-3a) y por una correlación HMBC de H-5 al carbonilo C-3 (**Figura 47**).

Para el compuesto **76** en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observa que se pierde la señal del hidrógeno del C-1, también se pierden las señales para los fenoles en C-9 y C-4' debido a que fueron elementos intercambiables con el disolvente (CDCl<sub>3</sub>), la pequeña señal en 11.98 ppm pertenece al hidrógeno del fenol en C-4. En cuanto a las señales similares se observaron los dos dobletes en  $\delta_H$  5.18 y 4.94 ( $J = 12.4$  Hz) correspondientes a los dos hidrógenos de metileno (H-1'), dos singuletes de metilo

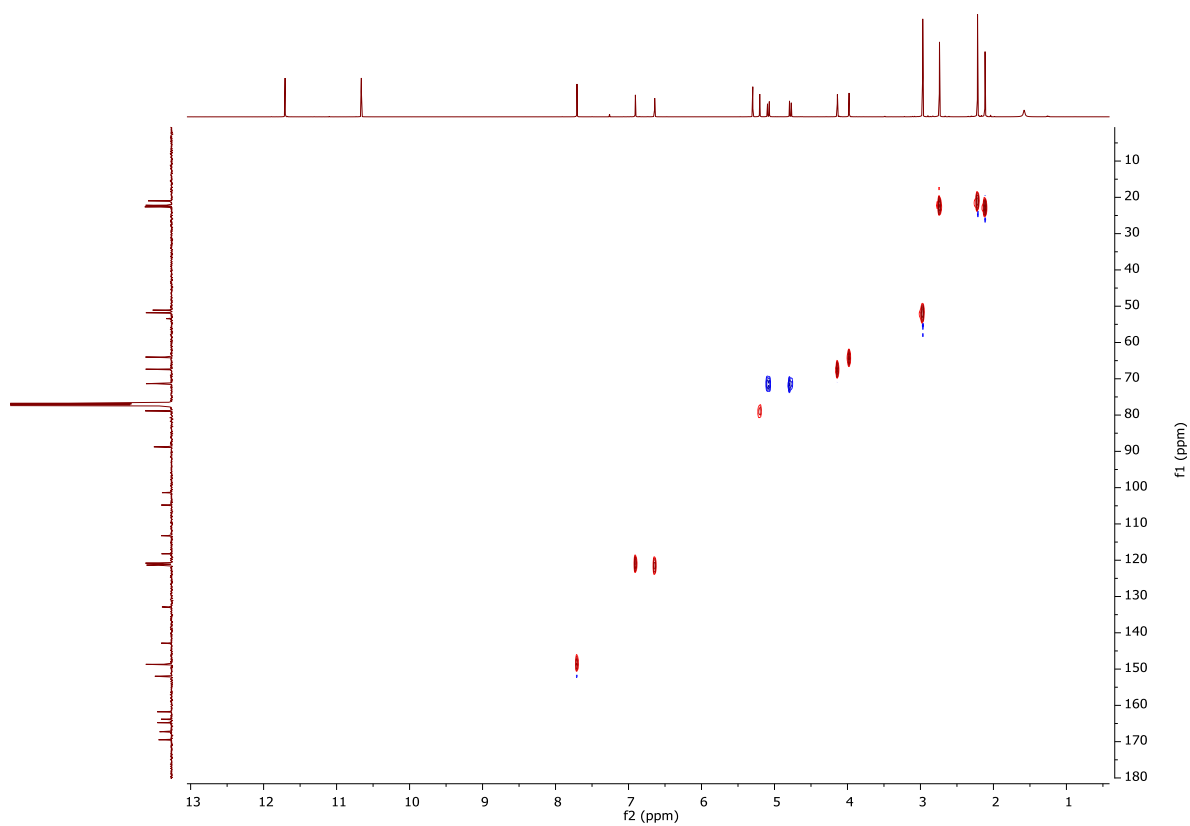
(3.10 y 2.57 ppm) contiguos a los protones aromáticos en 7.05 y 6.82 ppm referentes a los metilos de doble enlace, y el singulete en 2.07 ppm que se atribuye al grupo acetilo del C-9'. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C presenta señales para 28 carbonos, siendo congruente con la fórmula molecular establecida. Los desplazamientos químicos para los carbonos de la unidad base fueron similares a los de duclauxina (**64**) y talaromycesona B (**75**) ya que comparten el monómero común de oxafenalenona. La señal diferente en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C es una referente a un carbonilo en  $\delta_c$  164.6 (C-1), que junto con la señal del carbonilo  $\delta_c$  167.5 en C-3 dan identidad al compuesto.

Para el compuesto **77** en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observa la pérdida de la señal del hidrógeno en C-1, también se ven señales que en los espectros de los otros compuestos no se observan, incluyendo una señal en 7.55 ppm perteneciente a un hidrógeno aromático y una señal en 10.57 ppm perteneciente a un carbonilo. En cuanto a las señales similares con los demás compuestos se observa una señal en 11.98 ppm perteneciente al hidrógeno del fenol del C-9, dos dobletes en  $\delta_H$  5.14 y 4.91 ( $J = 12.3$  Hz) correspondientes a dos hidrógenos del metileno en C-1'. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C presenta señales para 27 carbonos, siendo congruente con la fórmula molecular establecida de este compuesto. La información de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C muestra señales características de oxafenalenona. Los carbonos e hidrógenos de la unidad base son similares a los de los compuestos anteriormente descritos. Sin embargo, no se observan las señales características para C-3 y C-1, lo que sugiere que no se forma el anillo de la unidad principal. Además, los desplazamientos químicos de un carbonilo en  $\delta_c$  193.6 sumados al protón en  $\delta_H$  10.57 (HCO) indicaron la presencia de un grupo aldehído. Las correlaciones del experimento HMBC mostraron el cruce del protón del aldehído H-CO con el C-9 y C-9a (**Figura 53**), confirmando la estructura como bacillisporina G (**77**).

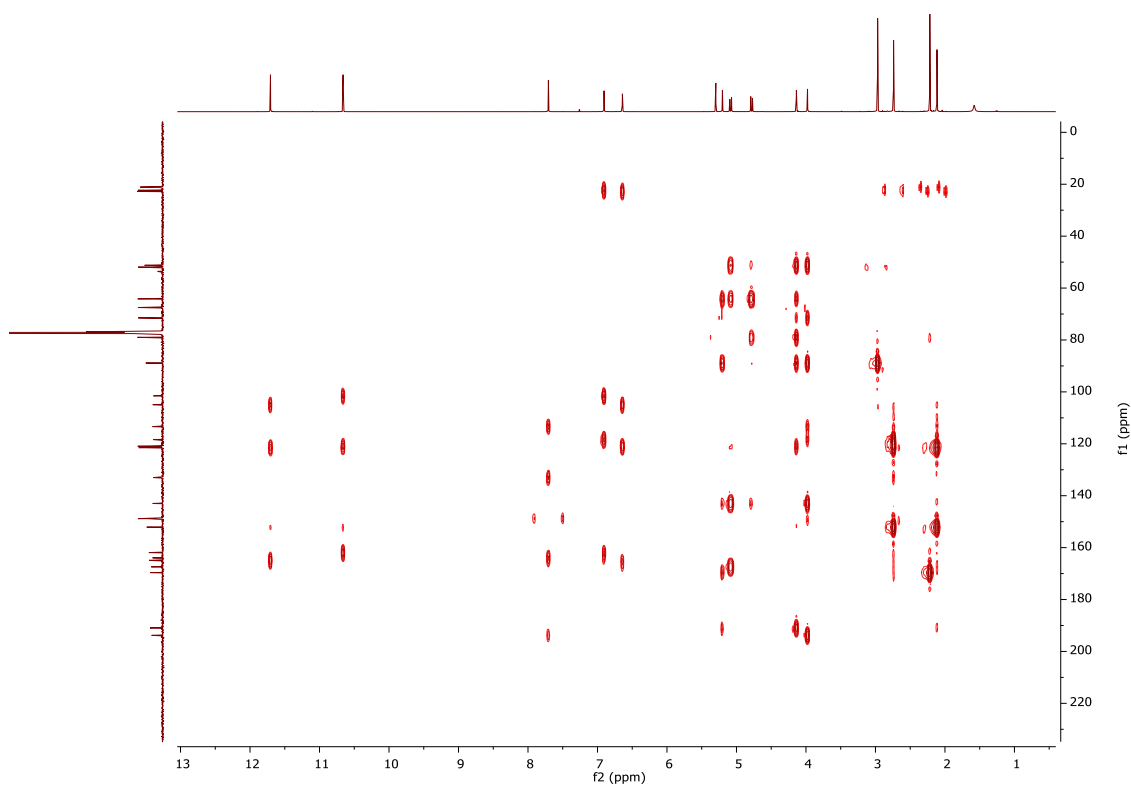
El análisis anterior en conjunto con los espectros bidimensionales HSQC (**Figura 38** duclauxina (**64**), **Figura 41** talaromycesona B (**75**), **Figura 44** xenoclauxina (**76**) y **Figura 47** bacillisporina G (**77**)) y HMBC (**Figura 39** duclauxina (**64**), **Figura 42** talaromycesona B (**75**), **Figura 45** xenoclauxina (**76**) y **Figura 48** bacillisporina G (**77**)) de los cuatro compuestos permitió la elucidación de la estructura de dichos productos naturales. A continuación se presentan las correlaciones observadas y los espectros HSQC y HMBC de cada compuesto.



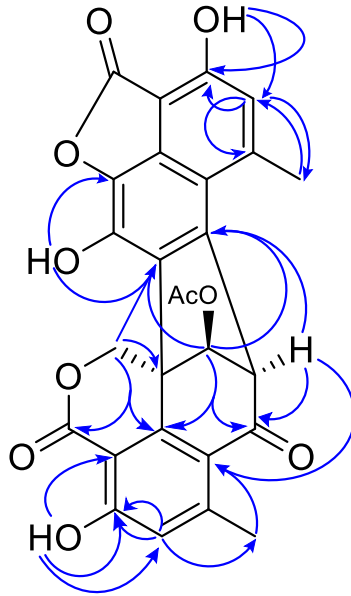
**Figura 37.** Correlaciones principales observadas en el espectro bidimensional HMBC de duclauxina (**64**).



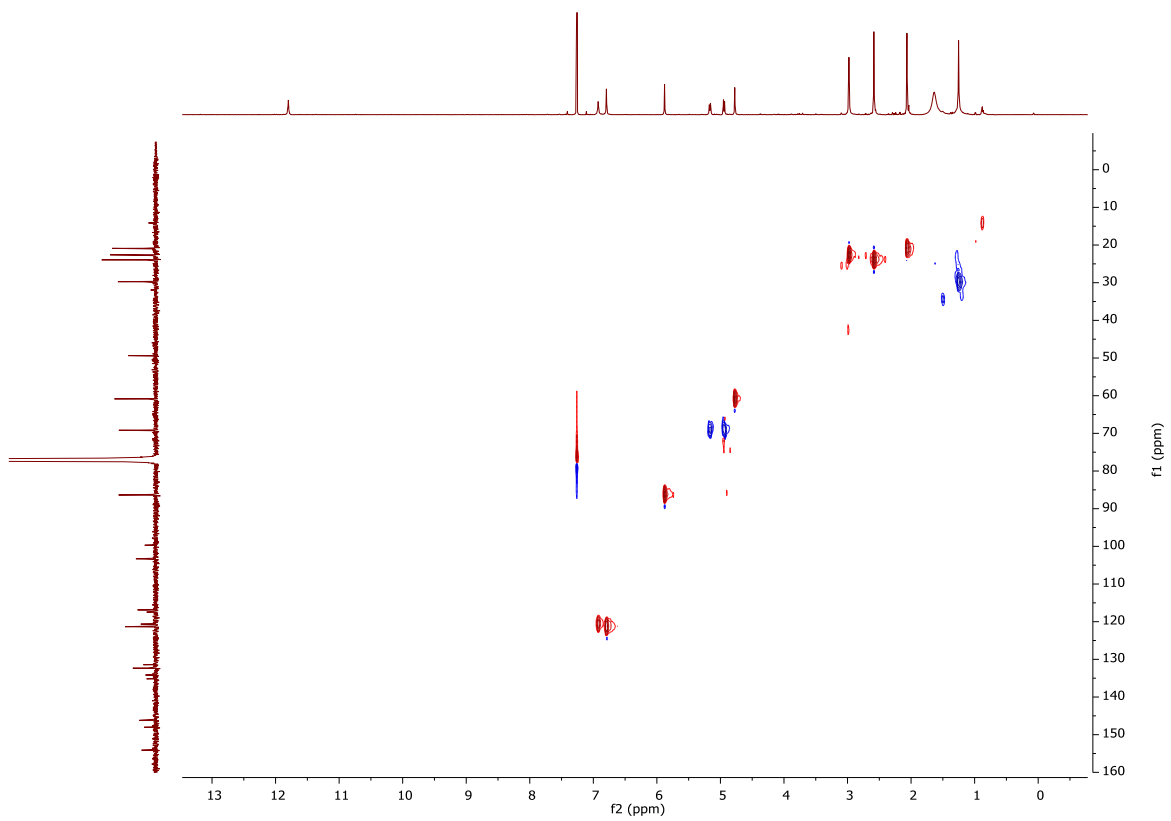
**Figura 38.** Espectro bidimensional HSQC de la duclauxina (**64**).



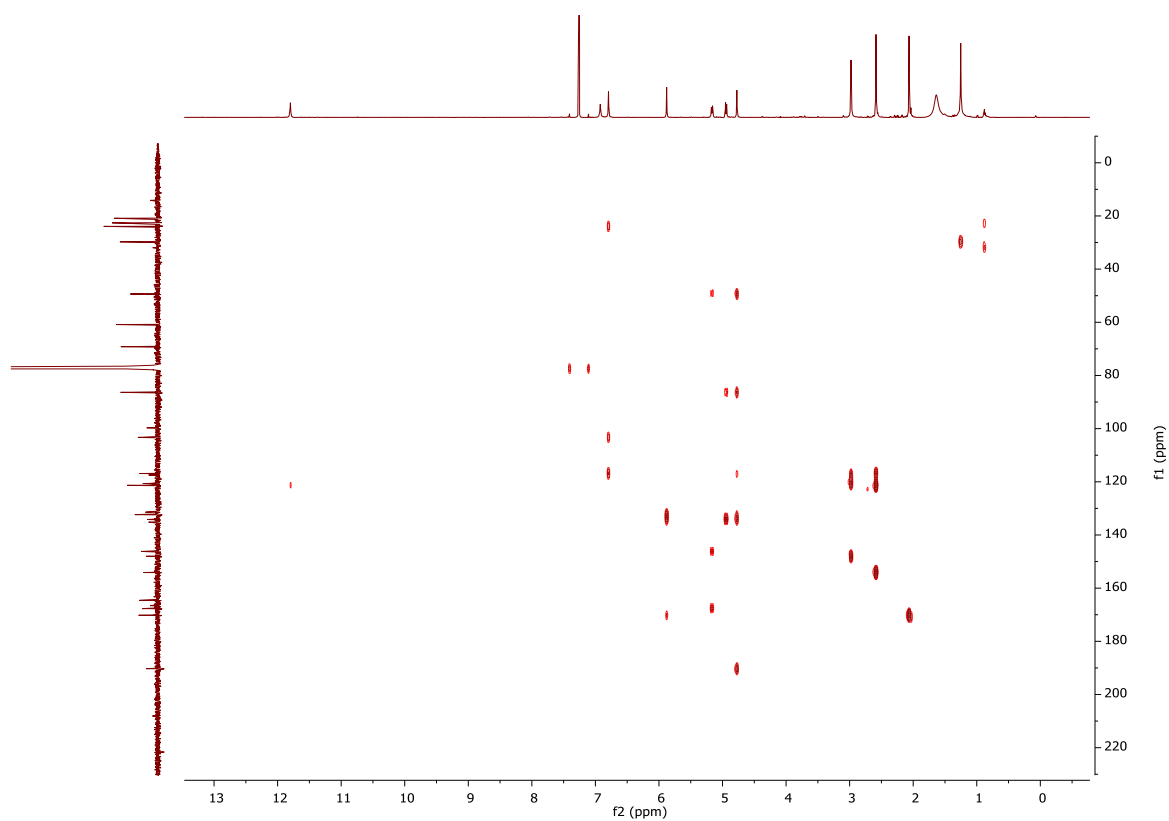
**Figura 39.** Espectro bidimensional HMBC de la duclauxina (**64**).



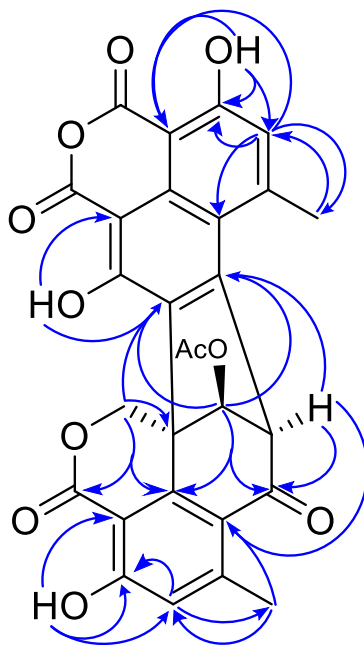
**Figura 40.** Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC de talaromycesona B (**75**).



**Figura 41.** Espectro bidimensional HSQC de la talaromycesona B (**75**).



**Figura 42.** Espectro bidimensional HMBC de la talaromycesona B (75).



**Figura 43.** Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC de xenoclauxina (76).

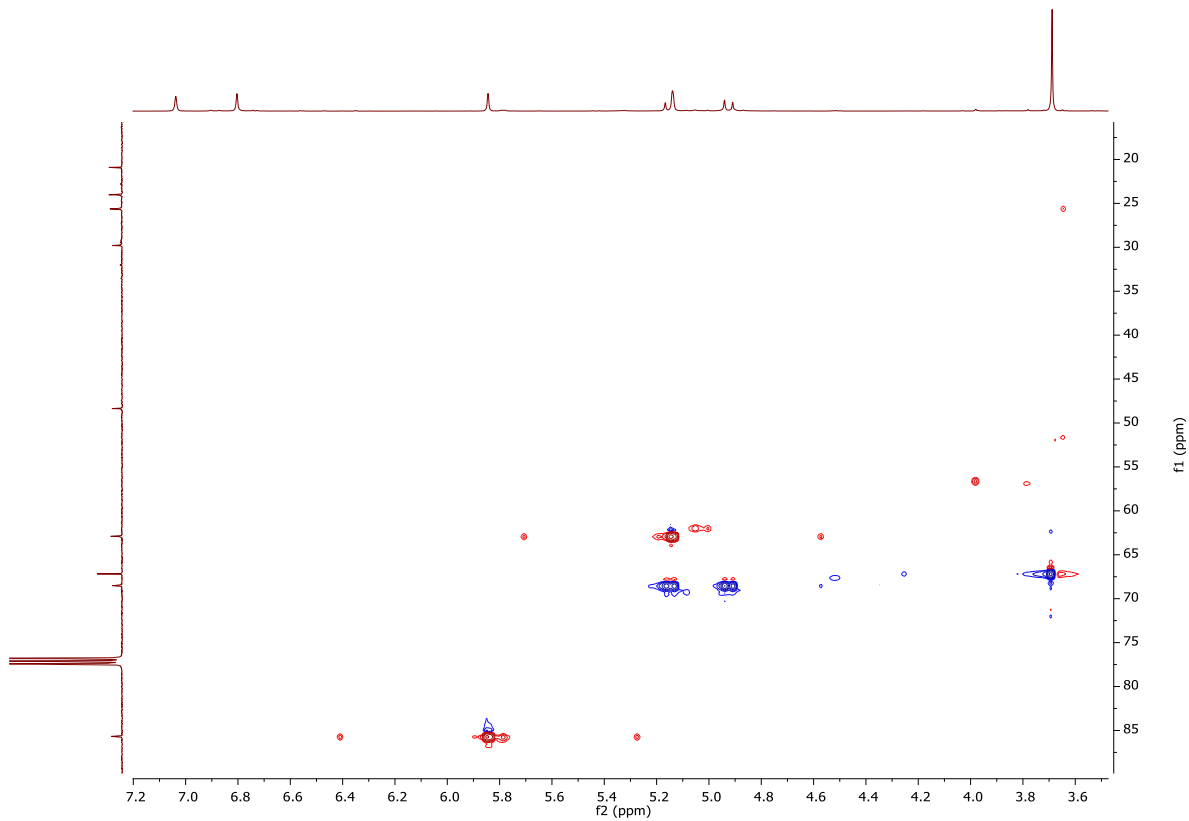


Figura 44. Espectro bidimensional HSQC de la xenoclauxina (76).

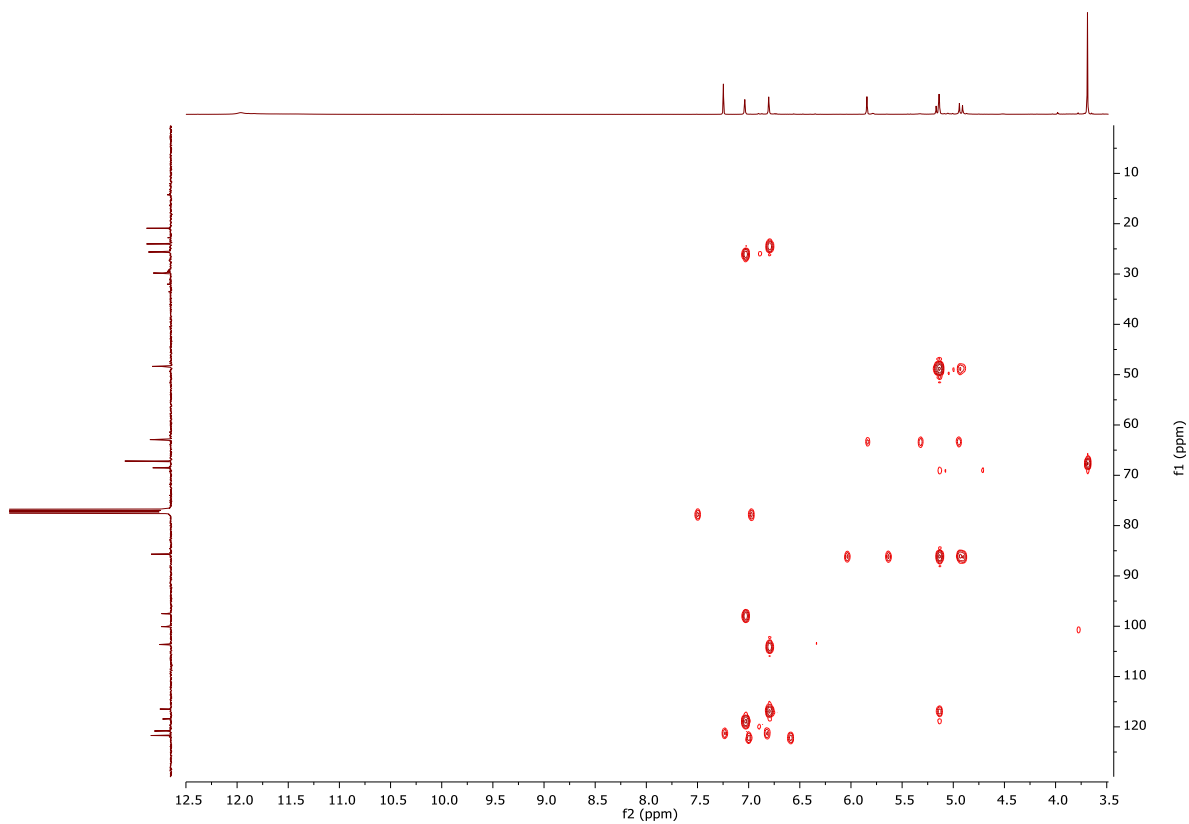
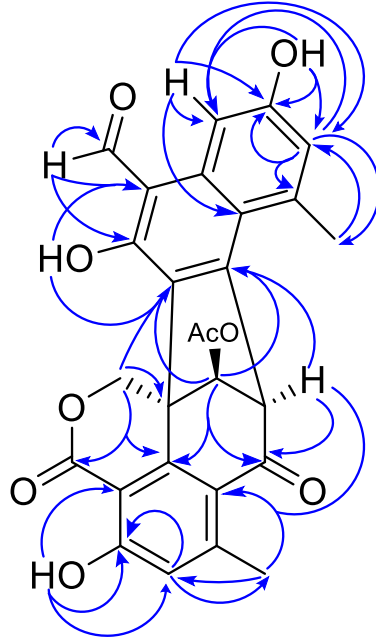
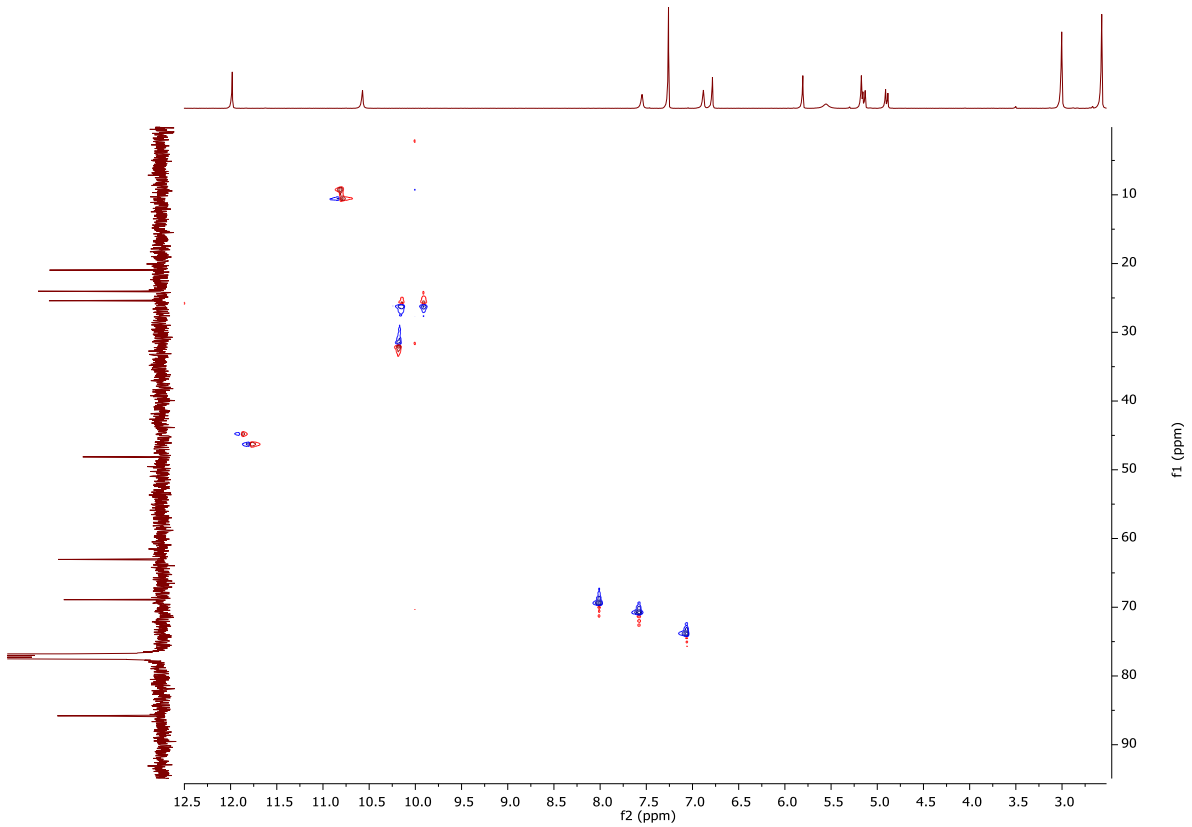


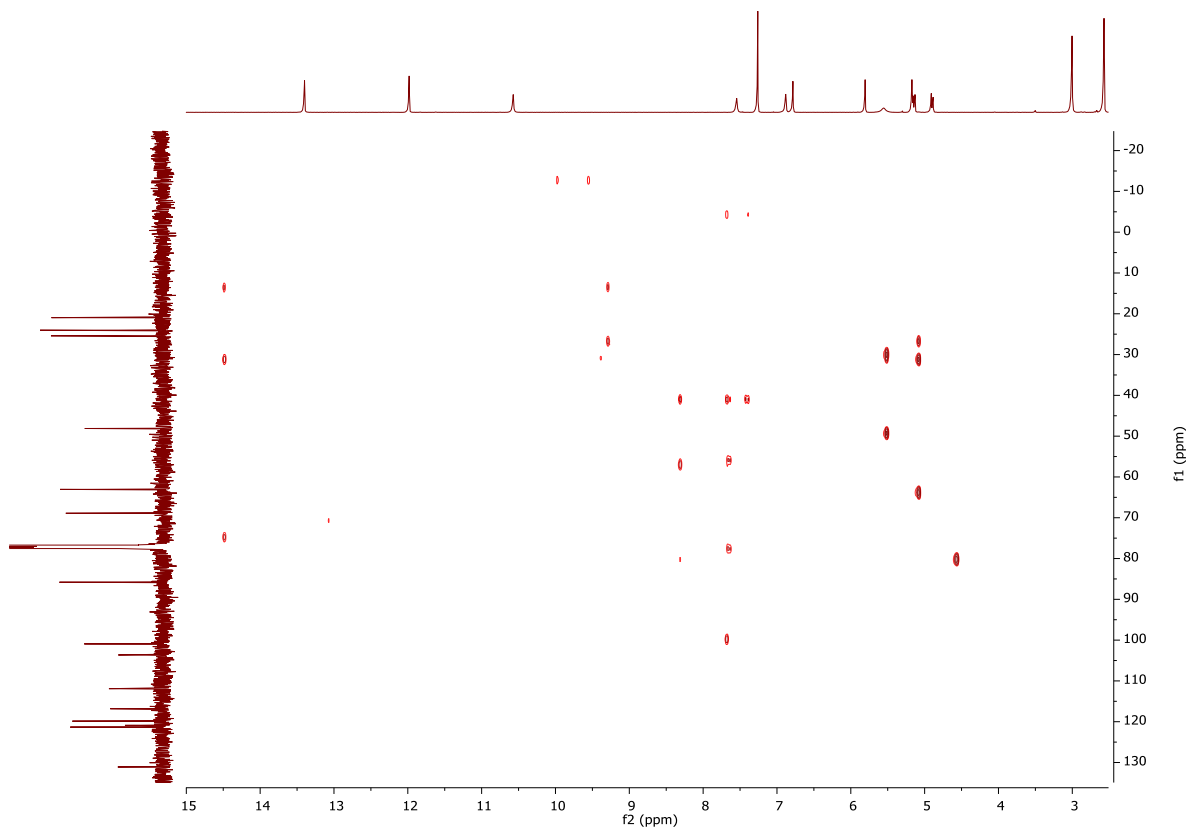
Figura 45. Espectro bidimensional HMBC de la xenoclauxina (76).



**Figura 46.** Correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC de bacillisporina G (77).



**Figura 47.** Espectro bidimensional HSQC de la bacillisporina G (77).

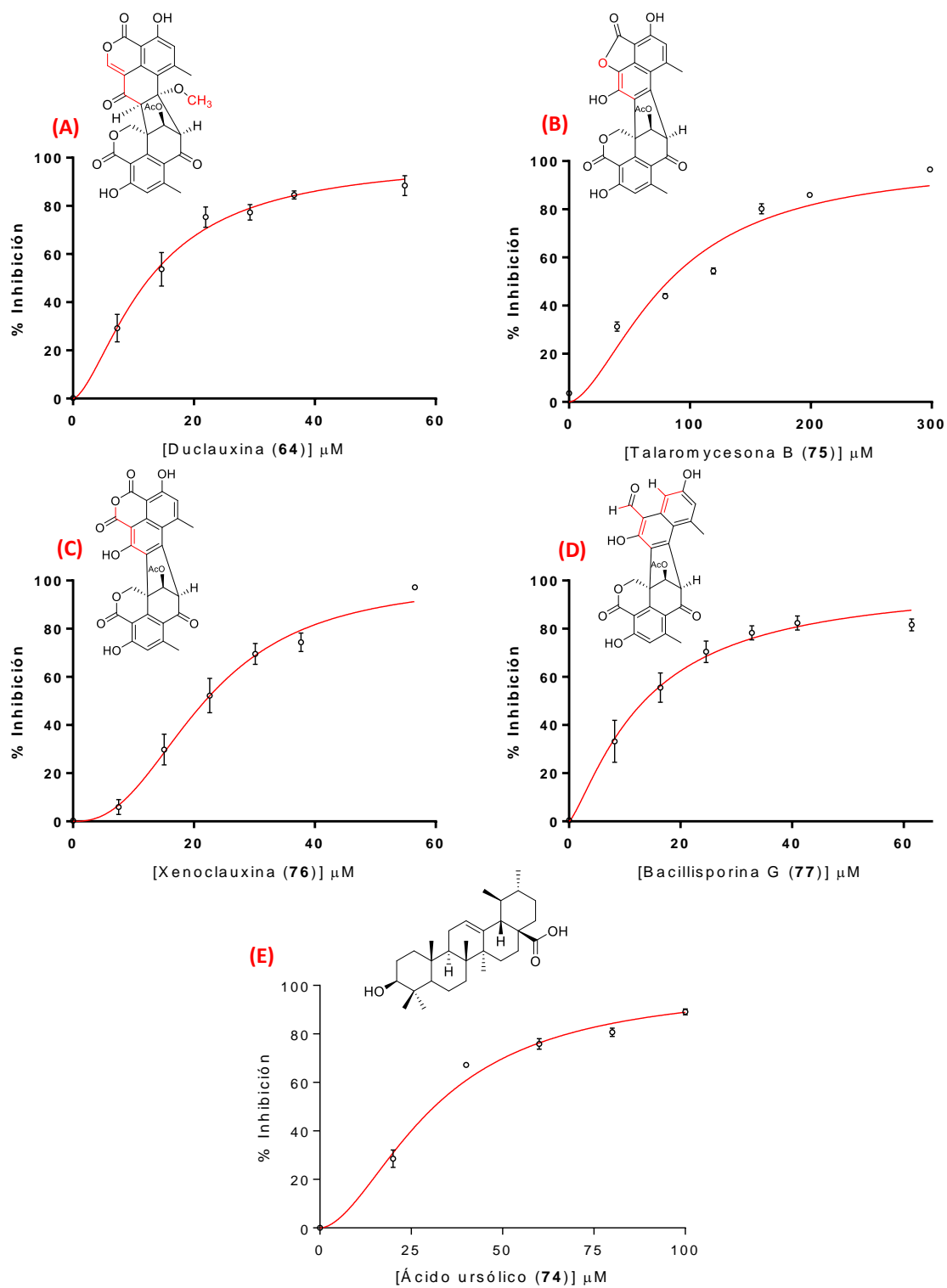


**Figura 48.** Espectro bidimensional HMBC de la bacillispirina G (**77**).

### 7. 7. Evaluación del efecto inhibitorio de duclauxina (**64**), xenoclauxina (**75**), talaromycesona B (**76**) y bacillispirina G (**77**) sobre la actividad de la *h*PTP1B<sub>1-400</sub>

Con la finalidad de comprobar si los cuatro compuestos aislados son los metabolitos responsables de la actividad inhibitoria mostrada por el extracto orgánico, se determinó su potencial inhibitorio contra la enzima *h*PTP1B<sub>1-400</sub>. Las evaluaciones se llevaron a cabo bajo las condiciones mencionadas en el apartado 6.12. Los resultados indicaron que todos los compuestos inhibieron a la *h*PTP1B<sub>1-400</sub>, la duclauxina (**64**) tuvo una  $CI_{50}$  de  $12.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , la talaromycesona B (**75**) una  $CI_{50}$  de  $82.1 \pm 4.8 \mu\text{M}$ , la xenoclauxina (**76**) una  $CI_{50}$  de  $21.8 \pm 0.6 \mu\text{M}$  y la bicillispirina G (**77**) tuvo una  $CI_{50}$  de  $13.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$ . Los compuestos **64**, **76** y **77** fueron más potentes que el control positivo ácido ursólico (**74**) que tuvo una  $CI_{50}$  de  $26.6 \pm 1.8 \mu\text{M}$ , siendo la duclauxina (**64**) 2.1 veces más potente que el control positivo y la bacillispirina G (**77**) dos veces más potente. En la **Figura 49** se observan las cinco curvas de concentración-respuesta para los compuestos evaluados.





**Figura 49.** Curvas de concentración-respuesta. (A) duclauxina (64), (B) talaromycesona B (75), (C) xenoclauxina (76), (D) bacillisporina G (77), (E) ácido ursólico (74).

Es importante destacar que la evaluación de los compuestos como inhibidores de la PTP1B es el primer reporte y complementa la información de sus propiedades terapéuticas.

### 7. 8. Estudios de cinética enzimática para de determinar el tipo de inhibición de la duclauxina (64) y ácido ursólico (74)

Con la finalidad de caracterizar el tipo de inhibición de la duclauxina (64) y el ácido ursólico (74) como inhibidores de la *h*PTP1B<sub>1-400</sub> se realizaron estudios de cinética enzimática empleando distintas concentraciones de sustrato (*p*-NPP, 0.5-10 mM). Los experimentos se llevaron a cabo bajo las condiciones mencionadas en el apartado 6.13. Para el compuesto 64 se obtuvo una  $k_i$  experimental de 11.5  $\mu$ M y para el compuesto 74 una  $k_i$  experimental de 26.5  $\mu$ M. El tipo de inhibición que se determinó para la duclauxina (64) fue de tipo mixta con un  $R^2$  de 0.9741 y un valor de  $\alpha = 3.3$ , mientras que el tipo de inhibición determinado para el ácido ursólico (74) fue no competitiva con un  $R^2$  de 0.9747. A mayor valor de  $k_i$  la unión del inhibidor con la enzima es más débil [139].

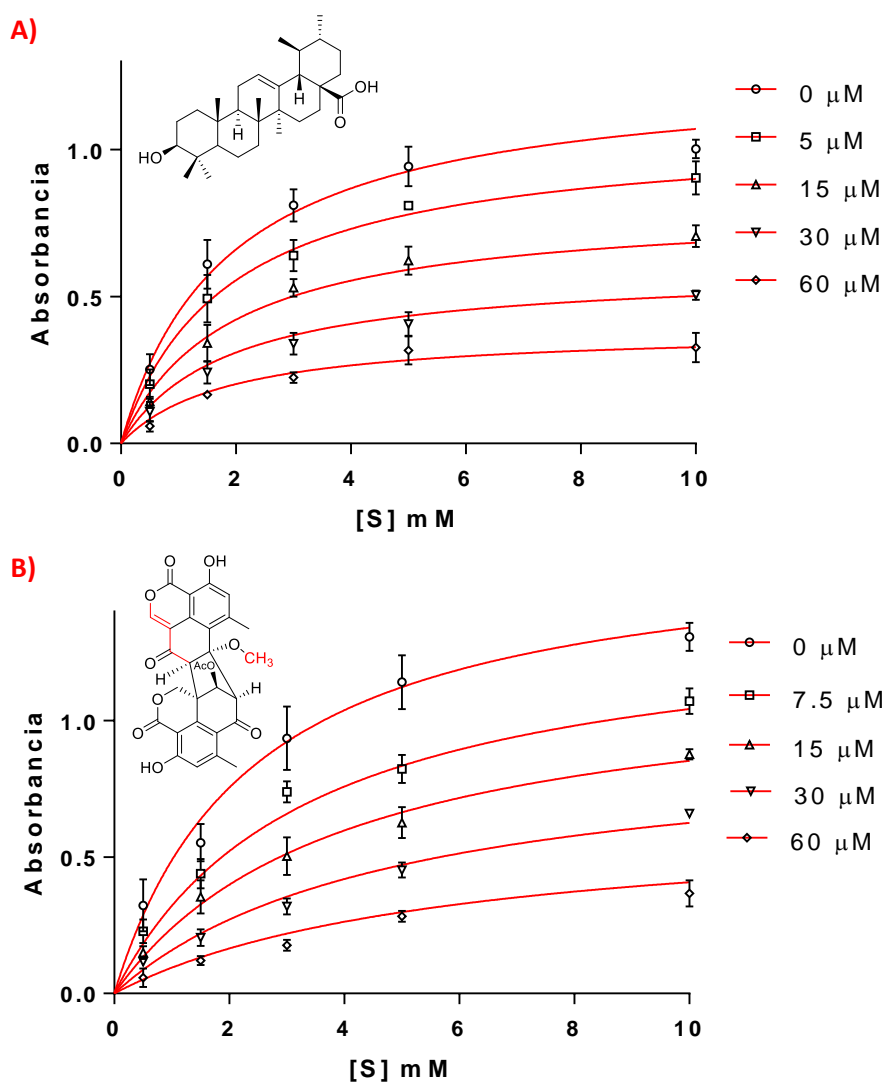
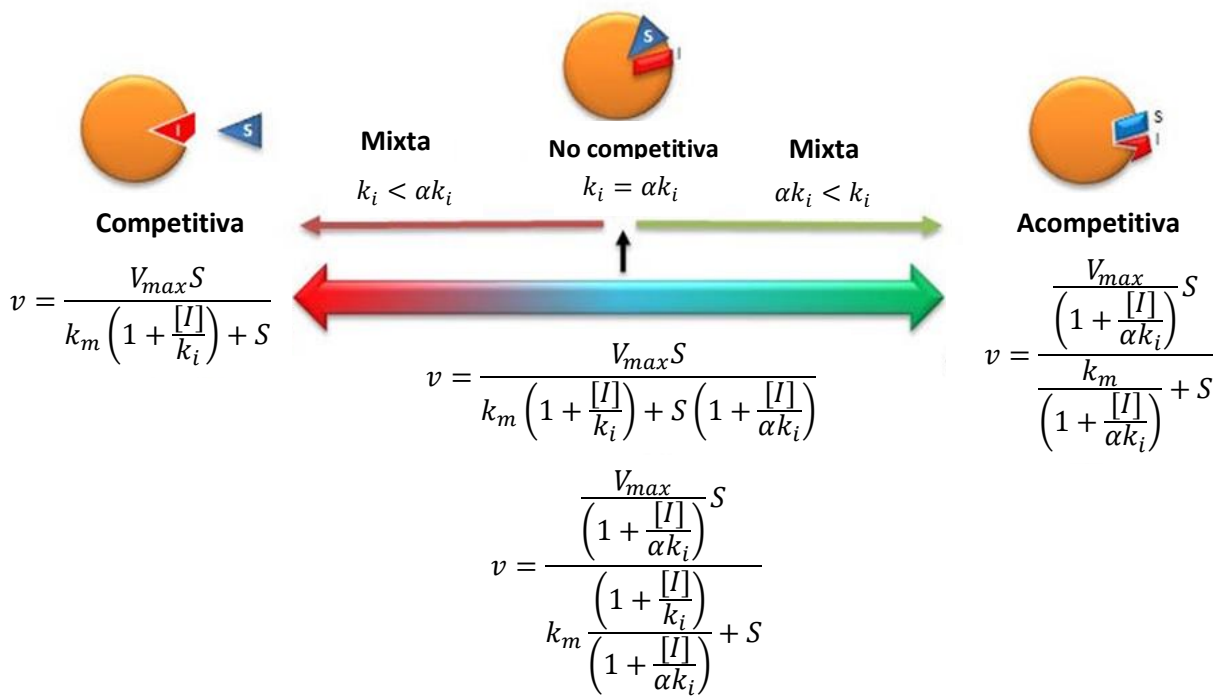


Figura 50. Cinéticas enzimáticas de (A) ácido ursólico (74) y (B) duclauxina (64).

En el tipo de inhibición mixta la unión del inhibidor es en un sitio distinto al sitio catalítico de la enzima. La inhibición mixta nos indica que el inhibidor tiene afinidad por la E y el complejo ES, mas estas afinidades son distintas. En este tipo de inhibición, el inhibidor puede unirse a la enzima pero su afinidad por ésta es alterada cuando se une el sustrato. En la mayoría de las circunstancias, este tipo de inhibición es alostérica porque el inhibidor se une a un sitio diferente al del sustrato. Los inhibidores mixtos interfieren con la unión del sustrato (aumentando la  $K_m$ ) y también obstaculizan la catálisis (disminuyendo  $V_{max}$ ) [140] (**Figura 51**).

Como la inhibición mixta, en la inhibición no competitiva la unión del inhibidor es en un sitio distinto al sitio catalítico de la enzima por lo que no compite con el sustrato. Sin embargo, a diferencia de la inhibición mixta, en la inhibición no competitiva la afinidad del inhibidor por la E y por el complejo ES es igual. Es decir, en esta forma de inhibición enzimática no se afecta la unión del sustrato pero se reduce la catálisis, por lo tanto no hay ningún efecto sobre la  $K_m$  pero la  $V_{max}$  disminuye [140] (**Figura 51**).



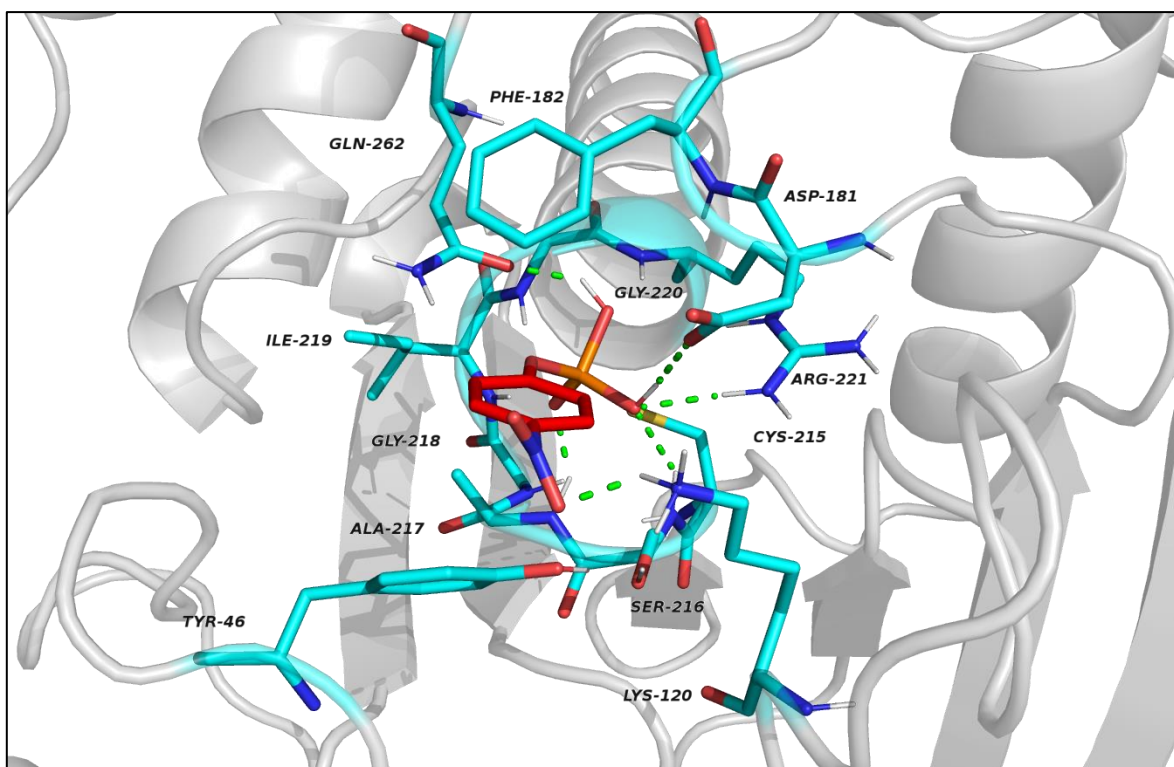
**Figura 51.** Características de la inhibición no competitiva y mixta. Modificado de [141].

El modelo de inhibición mixta tiene un parámetro ( $\alpha$ , alfa) que brinda información sobre el mecanismo de inhibición. El valor de  $\alpha$  determina el grado en que la unión del inhibidor con la enzima cambia la afinidad de ésta por el sustrato. Su valor siempre es mayor que cero, existiendo tres posibilidades: cuando el valor de  $\alpha = 1$  el inhibidor no altera la unión del sustrato con la enzima y el modelo mixto es idéntico a la inhibición no competitiva, cuando el valor de  $\alpha$  es muy grande la unión del inhibidor evita la unión del sustrato y el modelo mixto se vuelve idéntico a la inhibición competitiva, cuando el valor de  $\alpha$  es muy pequeño (pero mayor que cero) la unión del inhibidor mejora la unión del sustrato a la enzima y el modelo mixto se vuelve casi idéntico a un modelo no competitivo [140].

## 7.9. Acoplamiento molecular

Con el objetivo de predecir los posibles sitios de unión de cada compuesto con la PTP1B se realizaron estudios de acoplamiento molecular.

Para validar el método de acoplamiento molecular se utilizó la estructura cristalográfica de la PTP1B cristalizada con buffer Tris y glicerol (PDB ID: 1SUG) y la estructura del sustrato (*p*-NPP). La validación se realizó con el sustrato de la enzima ya que no existen ligantes co-cristalizados con la estructura 1SUG, y los *dockings* realizados con ligantes co-cristalizados con otras PTP1Bs se unen en sitios distintos probablemente como resultado de los ajustes inducidos por la unión. Los parámetros empleados para el estudio de validación fueron idénticos a los empleados con los ligantes evaluados duclauxina (**64**), talaromycesona B (**75**), xenoclauxina (**76**), bacillisporina G (**77**) y ácido ursólico (**74**). Los resultados de la validación (**Figura 52**) muestran que el *p*-NPP se une en el sitio catalítico de la enzima [142], validando los resultados obtenidos de las simulaciones. Los aminoácidos involucrados en la interacción incluyen a Cys-215, Ser-216, Ala-217, Gly-218, Ile-219, Gly-220 y Arg-221 pertenecientes al *loop* P, a Tyr-46, Lys-120, Asp-181 y Phe-182 pertenecientes al *loop* W y la Gln-262 perteneciente al *loop* Q. Las fuerzas que gobiernan la interacción incluyen seis enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo hidrofílicas.



**Figura 52.** Modelo estructural del sustrato (*p*-NPP) en complejo con la *h*PTP1B<sub>1-300</sub> (PDB ID: 1SUG). Aminoácidos involucrados (bastones azules) en el sitio de unión del *p*-NPP (bastones rojos) y los puentes de hidrógeno (verde) en la interacción.

Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con la estructura PDB ID: 1SUG. Dicho modelo de la enzima consta de 300 aminoácidos (*h*PTP1B<sub>1-300</sub>). Los resultados del acoplamiento molecular indicaron que la duclauxina (**64**) se une a la *h*PTP1B<sub>1-300</sub> en el mismo sitio que la talaromycesona B (**75**), por su parte la xenoclauxina (**76**) y la bacillisporina G (**77**) se unen a la *h*PTP1B<sub>1-300</sub> en el mismo sitio pero diferente al sitio de unión de **64** y **75**. El control positivo, el ácido ursólico (**74**), se une a la enzima en otro sitio diferente, como se observa en la **Figura 53**.

El análisis por agrupamiento (*clusters*) indicó que en todos los casos la posición seleccionada fue la de más baja energía, sin embargo no en todos los casos la posición de más baja energía fue la más poblada (**Tabla 19**). El análisis por agrupamiento ofrece una alternativa a la clasificación energética para la identificación de conformaciones probables y puede servir para reducir el número de conformaciones poco probables [143].

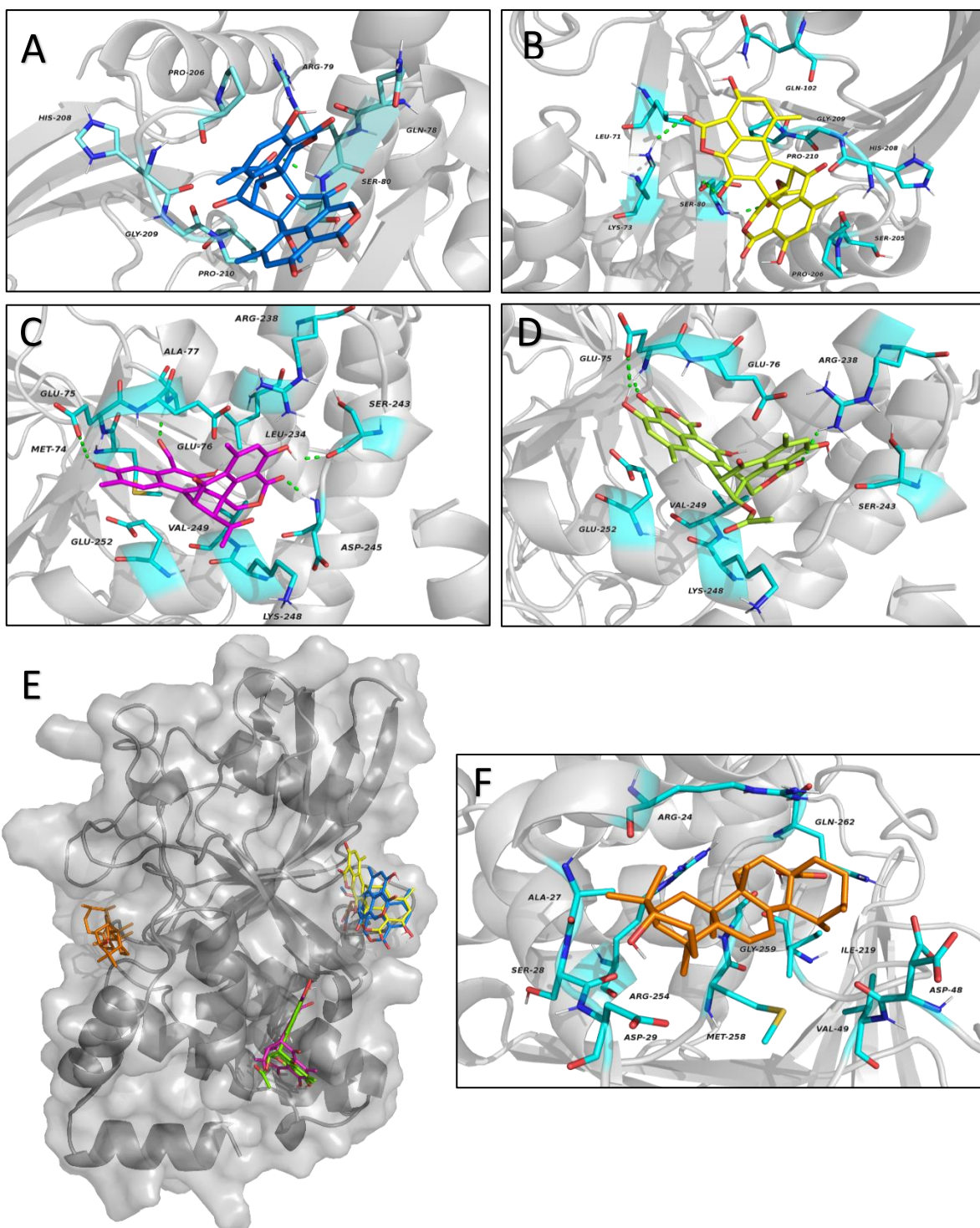
**Tabla 19.** Resumen resultados por análisis de *clusters* de las posiciones seleccionadas.

Compuesto	Energía libre de acoplamiento estimada (kcal/mol)	Número de conformaciones en <i>cluster</i>
Duclauxina ( <b>64</b> )	-7.21	10
Xenoclauxina ( <b>75</b> )	-7.98	5
Talaromycesona B ( <b>76</b> )	-8.27	11
Bacillisporina G ( <b>77</b> )	-9.42	6
Ácido Ursólico ( <b>74</b> )	-8.39	22

Los aminoácidos involucrados en la interacción con los cuatro compuestos son principalmente hidrofílicos. Para la duclauxina (**64**) los aminoácidos involucrados en la interacción incluyen a Pro-206, Gly-209, Pro-210, His-208, Arg-79, Gln-78 y Ser-80. En cuanto a la talaromycesona B (**75**), los aminoácidos involucrados en la interacción son His-208, Pro-210, Pro-206, Ser-205, Ser-80, Gly-209, Lys-73, Leu-71 y Gln-102. Para la xenoclauxina (**76**) los aminoácidos involucrados en la interacción son Lys-248, Val-249, Glu-252, Ser-243, Arg-238, Glu-76 y Glu-75. En el caso de la bacillisporina G (**77**) los aminoácidos involucrados en la interacción son Arg-238, Leu-234, Glu-76, Ala-77, Met-74, Glu-75, Ser-243, Val-249, Lys-248, Asp-245, Glu-252. Finalmente, para el ácido ursólico (**74**) los aminoácidos involucrados en la interacción son Val-49, Asp-48, Met-258, Arg-24, Asp-29, Ser-28, Ala-27, Arg-254, Ile-219, Gly-259 y Gln-262.

En todos los casos las fuerzas que gobiernan la interacción incluyen enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo hidrofílicas.

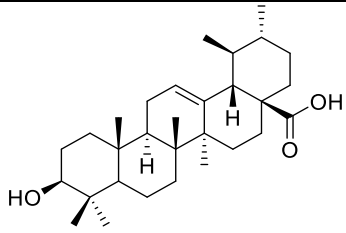
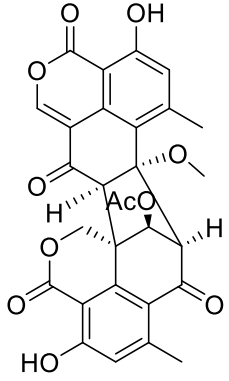
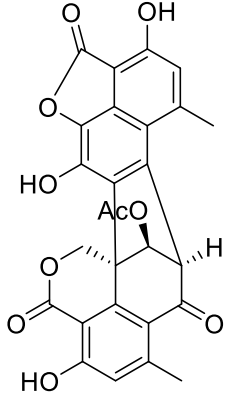
A pesar de que los cuatro compuestos tengan una configuración *S* en el C-9', no se predijo el mismo sitio de unión para todos en el estudio de acoplamiento molecular. Sin embargo, observamos que los compuestos **64** y **75** comparten en su unidad principal una lactona de cinco y seis miembros respectivamente, lo que permite entender por qué se unen ambos compuestos en el mismo sitio pero con afinidades distintas. Mientras que para las estructuras 3D del compuesto **76** y el **77** se observó que son casi planas, entendiendo así que al tener conformaciones en el espacio similares se unen al mismo sitio, pero diferente al que se unen los otros dos compuestos.



**Figura 53.** Modelos estructurales de los cuatro compuestos y el control positivo en complejo con la *hPTP1B*<sub>1-300</sub>. Aminoácidos involucrados (bastones azules) en el sitio de unión de (A) compuesto **64**, (B) compuesto **75**, (C) compuesto **77**, (D) compuesto **76** con la *hPTP1B*<sub>1-300</sub>; (E) Sitio de unión de la duclauxina (**64**) (bastones azul marino), talaromycesona B (**75**) (bastones amarillos), bacillisporina G (**77**) (bastones morados), xenoclauxina (**76**) (bastones verdes) y ácido ursólico (**74**) (bastones naranjas) con la *hPTP1B*<sub>1-300</sub>; (F) Aminoácidos involucrados (bastones azules) en el sitio de unión del compuesto **74** con la *hPTP1B*<sub>1-300</sub>.

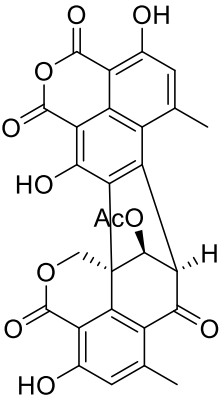
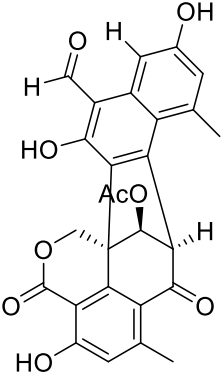
Con el este estudio de acoplamiento molecular se obtuvieron las constantes de acoplamiento estimadas de los cuatro compuestos y el control positivo así como la energía libre de acoplamiento estimada para cada uno de ellos, estos valores se resumen en la **Tabla 20**. Del punto de vista estructural, vemos pocas semejanzas entre el control positivo y los compuestos aislados, pues únicamente comparten el que todos son estructuras policíclicas, y a diferencia de los cuatro compuestos aislados, el control positivo no forma enlaces de hidrógeno con los aminoácidos de la proteína. Por lo anterior, se infiere que el control positivo al ser un triterpeno con una conformación no-planar y diferente a los compuestos aislados se unen en un sitio alejado de los sitios de unión de los derivados de fenalenonas.

**Tabla 20.** Resumen resultados acoplamiento molecular de los cuatro compuestos y el control positivo.

Compuesto	Energía libre de acoplamiento estimada (kcal/mol)	$k_i$ estimada ( $\mu\text{M}$ )	$k_i$ experimental ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CI}_{50}$ experimental ( $\mu\text{M}$ )
 Ácido Ursólico (74)	-8.39	0.71	26.5	26.6 $\pm$ 1.8
 Duclauxina (64)	-7.21	5.16	11.5	12.7 $\pm$ 0.5
 Talaromycesona B (75)	-8.27	0.86	ND	82.1 $\pm$ 4.8

\*ND: No determinada.

**Tabla 19.** Resumen resultados acoplamiento molecular de los cuatro compuestos y el control positivo (continuación).

Compuesto	Energía libre de acoplamiento estimada (kcal/mol)	$k_i$ estimada ( $\mu\text{M}$ )	$k_i$ experimental ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CI}_{50}$ experimental ( $\mu\text{M}$ )
 <p>Xenoclauxina (<b>76</b>)</p>	-7.98	1.41	ND	$21.8 \pm 0.6$
 <p>Bacillisporina G (<b>77</b>)</p>	-9.42	0.12	ND	$13.5 \pm 0.7$

\*ND: No determinada.

Los resultados obtenidos a partir de los estudios de acoplamiento molecular para los cuatro compuestos indicaron que éstos se pueden unir en sitios diferentes del sitio catalítico de la enzima, que está integrado por el *loop* PTP que contiene la Cys-215 responsable de ejecutar el ataque nucleofílico en el grupo fosfato del sustrato; el *loop* WPD que es flexible y permite que el sitio activo funcione en conformación abierta o cerrada, en su conformación abierta deja accesible el sitio catalítico al sustrato y una vez que se une el sustrato éste se cierra y acerca el residuo de Asp-181 para la catálisis; y el *loop* Q donde el residuo de Gln-262 actúa en conjunto con el residuo Asp-181 para hidrolizar el intermediario fosfato-cisteína [25].

Los estudios de acoplamiento molecular generalmente suponen un receptor o macromolécula rígida, pero en realidad la mayoría de las macromoléculas alteran su sitio de unión para adaptarse a la forma y al modo de unión del ligando. Esto se conoce como ajuste inducido y es uno de los principales factores que complican el proceso de diseño de fármacos basado en la estructura [144]. Es importante mencionar que en los estudios de acoplamiento molecular realizados no se consideró el estudio de los efectos de ajuste inducido, sin embargo, se están realizando cálculos de dinámica



molecular para evaluar los parámetros energéticos de los complejos PTP1B-LIGANDO en solución acuosa.

Se puede decir entonces, que los resultados tanto del acoplamiento molecular como los obtenidos en los ensayos enzimáticos y a espera de los resultados de dinámica molecular, permiten proponer que los cuatro compuestos estudiados son inhibidores alostéricos, es decir, los inhibidores se unen en un sitio diferente al sitio activo y cambian la conformación de la enzima de alguna manera para que ésta se inactive.

Una inhibición de tipo alostérica tiene varias ventajas. Por un lado brindan la oportunidad de inactivar la enzima sin cerrar completamente la vía de señalización, por lo tanto, los inhibidores alostéricos podrían ser una excelente opción para inhibir la actividad de la enzima evitando efectos secundarios. A la concentración correcta, los inhibidores alostéricos pueden actuar en un contexto específico y dirigirse de manera específica. Además, los inhibidores alostéricos tienen la ventaja de que su potencia no se ve afectada por la concentración del sustrato. Por otro lado, si una enzima es parte de una familia de enzimas, caso de la PTP1B, entonces su sitio catalítico suele ser muy conservado, por lo que en la mayoría de las veces es ineficaz emplear inhibidores contra el sitio activo [145].

En general, los derivados de fenalenonas que se distribuyen en la naturaleza son un grupo de compuestos con una diversidad rica tanto de estructuras como de bioactividades [115]. La duclauxina (**64**), la talaromycesona B (**75**), la xenoclauxina (**76**) y la bacillisporina G (**77**) pertenecen al grupo de las oxafenalenonas y se han aislado anteriormente de *Talaromyces duclauxi*, *Talaromyces stipitatus* y *Talaromyces* sp. [88, 115]. Se ha demostrado que la duclauxina (**64**) y algunos de sus análogos tienen actividad antitumoral [130, 131], sin embargo, su actividad como antidiabéticos no se ha estudiado a fondo.

Con este trabajo se pone en evidencia el valor de los microorganismos fúngicos que habitan en las regiones menos exploradas de México como fuente fértil de entidades químicas con actividad biológica promisorias. En particular, las especies del género *Talaromyces* se proyectan como una mina de oportunidades para buscar agentes útiles en la terapéutica de la DMTII, la obesidad y el cáncer. Es importante subrayar que la información generada en este proyecto constituye el primer reporte de la duclauxina (**64**), la talaromycesona B (**75**), la xenoclauxina (**76**) y la bacillisporina G (**77**) sobre la *hPTP1B<sub>1-400</sub>*. Por lo tanto, surge la necesidad de seguir estudiando y buscando más análogos de fenalenonas como agentes inhibidores de esta fosfatasa, así como continuar con el estudio de especies del género *Talaromyces* y/o relacionadas con éste.

## 8. Conclusiones

Este proyecto demostró que nichos ecológicos como hormigueros albergan una gran diversidad de microorganismos fúngicos útiles para la obtención de compuestos bioactivos, algunos de los cuales podrían ser utilizados en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la DM2, la obesidad o algunos tipos de cáncer.

Se logró establecer un método enzimático con la *hPTP1B<sub>1-400</sub>* para la búsqueda de compuestos de origen fúngico con potencial hipoglucemiante o antitumoral. Se establecieron las concentraciones de sustrato y ácido ursólico (**74**) a emplear en el ensayo de inhibición de *hPTP1B<sub>1-400</sub>*.

Se evaluaron los extractos orgánicos del microorganismo seleccionado como inhibidores de la *hPTP1B<sub>1-400</sub>* obteniendo altos porcentajes de inhibición, en específico del extracto del microorganismo IQ-313, generado a partir del medio de cultivo de Cheerios®.

El estudio químico de la especie fúngica IQ-313 (*Talaromyces* sp.) permitió el aislamiento y la identificación de cuatro compuestos de tipo fenalenona: duclauxina (**64**), talaromycesona B (**75**), xenoclauxina (**76**) y bacillisporina G (**77**), mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Los cuatro compuestos inhibieron a la enzima *hPTP1B<sub>1-400</sub>*. La duclauxina (**64**) tuvo una  $CI_{50}$  de  $12.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , la talaromycesona B (**75**) una  $CI_{50}$  de  $82.1 \pm 4.8 \mu\text{M}$ , la xenoclauxina (**76**) una  $CI_{50}$  de  $21.8 \pm 0.6 \mu\text{M}$  y la bacillisporina G (**77**) tuvo una  $CI_{50}$  de  $13.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$ . Los compuestos **64** y **77** fueron 2.1 y 2 veces más potentes que el control positivo ( $CI_{50} = 26.6 \pm 1.8 \mu\text{M}$ ) respectivamente.

Se determinó el tipo de inhibición de la duclauxina (**64**) y el ácido ursólico (**74**) sobre la *hPTP1B<sub>1-400</sub>* mediante estudios de cinética enzimática. El tipo de inhibición determinado para el compuesto **64** fue una inhibición mixta, mientras que para el compuesto **74** fue una inhibición no competitiva.

Los estudios de acoplamiento molecular se validaron realizando el *docking* con el sustrato de la enzima y confirmando su unión en el sitio catalítico de ésta. Los resultados de estos estudios indicaron que los cuatro compuestos se pueden unir a la *hPTP1B<sub>1-300</sub>* de forma alostérica, es decir, en sitios diferentes al sitio catalítico de la enzima. En el presente trabajo no se consideraron los efectos de ajuste inducido, sin embargo, se están realizando cálculos de dinámica molecular para evaluar los parámetros energéticos de los complejos de la enzima con los ligandos en solución acuosa. La duclauxina (**64**) y la talaromycesona B (**75**) se unen al mismo sitio mientras que la xenoclauxina (**76**) y la bacillisporina G (**77**) se unen a un sitio distinto. El ácido ursólico (**74**) se une en un sitio distinto a los cuatro compuestos.

## 9. Perspectivas

Con base en los resultados de este proyecto se pretende lo siguiente:

- Realizar estudios de cinética enzimática de los tres compuestos restantes, xenoclauxina (**76**), bacillisporina G (**77**) y talaromycesona B (**75**), para determinar el tipo de inhibición que ejercen sobre la *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.
- Realizar el modelo por homología de la enzima *hPTP1B*<sub>1-400</sub> para posteriormente realizar estudios de acoplamiento molecular con los compuestos y ver si se unen en sitios diferentes.
- Se plantea la búsqueda de más análogos de duclauxina (**64**) en especies del género *Talaromyces* o relacionadas a éste, que prometan ser inhibidores de la *hPTP1B*<sub>1-400</sub>.

## 10. Referencias

1. Abdel, G. F. & Mohamed, K. Y. (2019) Natural Products for the Management of Diabetes. *Stu. in Nat. Prod. Chem.*, 59.
2. Belfiore, A., et. al. (2017) Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endo. Rev.*, 38(5):379–431.
3. Almanza, J. C., et. al. (2008) Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac. Méd. Méx.*, 144(6).
4. National Cancer Institute (2015). Cancer Treatment Research: Why cancer treatment research is critical to progress against disease opportunities. *Can. Res.*
5. Urruticochea, A. et. al. (2010). *Curr. Pharm. Des.* 16:3-10.
6. Kurnit, K. C. et. al. (2017). *Can. Res.* 77:e123-e126.
7. O'Brien, H. E., et. al. (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:5544–5550.
8. International Diabetes Federation. (2017) Diabetes Atlas. *IDF*, 8ª edición.
9. Gutiérrez, C., et. al. (2017) Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. *Gac. Med. Mex.*, 153:214-28.
10. International Diabetes Federation. (2019) About diabetes: Type 2 Diabetes. Descargado de: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html>
11. Ríos, J. L., Francini, F., Schinella, G. R. (2015) Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Plant. Med.* 81:975–994.
12. International Diabetes Federation. (2019). IDF North America and Caribbean members. Descargado de: <https://www.idf.org/our-network/regions-members/north-america-and-caribbean/members/66-mexico.html>
13. Instituto Nacional de Salud Pública. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. Informe Final de Resultados. Descargado de: [http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut\\_mc\\_2016-310oct.pdf](http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut_mc_2016-310oct.pdf)
14. Federación Mexicana de diabetes A. C. (2019). Estadísticas México. Descargado de: <http://fmdiabetes.org/category/estadisticas-mexico/>
15. INEGI. (2018). Comunicado de prensa número 525/18. Descargado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>
16. Kerru, N., et. al. (2018) Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *Euro. J. of Med. Chem.*, 152:436-488.
17. Sociedad Mexicana de Oncología, A. C. (2016). Descargado de: [https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC\\_GUIA.pdf](https://www.smeo.org.mx/descargables/COPREDOC_GUIA.pdf)
18. Douglas, H. & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144.
19. Roser, M. & Ritchie, H. (2019) Cancer: Our World In Data. Descargado de: <https://ourworldindata.org/cancer>
20. Globocan. (2018). Population Fact Sheets, “Mexico”. Descargado de: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
21. INEGI. (2018). Estadísticas con respecto al día mundial del cáncer. Comunicado de prensa No. 61/18.

22. Zhang, S. & Zhang, Z. Y. (2007) PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor Discovery. *Drug Dis. Tod.*, 12(9/10).
23. Bourdeau, A., et al. (2005) Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr. Opi. Cell Bio.*, 17:203–209.
24. Ruddaraju, K. V. & Zhang, Z. Y. (2017). Covalent inhibition of protein tyrosine phosphatases. *Mol. Bio. Syst.* Royal Society of Chemistry.
25. Feldhammer, M., et al. (2013) PTP1B: A simple enzyme for a complex world. *Cri. Rev. in Biochem. & Mol. Bio.*
26. Ezzat, S. M., et al. (2018) Looking at Marine-Derived Bioactive Molecules as Upcoming Anti-Diabetic Agents: A Special Emphasis on PTP1B Inhibitors. *Molecules.*, 23:3334.
27. Bandyopadhyay, D. et al. (1997) Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *J. Biol. Chem.*, 272:1639–1645.
28. Dadke, S. et al. (2000) Down-regulation of insulin signalling by protein-tyrosine phosphatase 1B is mediated by an N-terminal binding region. *J. Biol. Chem.*, 275:23642–23647.
29. Walchli, S. et al. (2000) Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor: a brute-force approach based on ‘substratetrapping’ mutants. *J. Biol. Chem.*, 275:9792–9796.
30. Goldstein, B.J. et al. (2000) Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.*, 275:4283–4289.
31. Calera, M.R. et al. (2000) Dynamics of protein-tyrosine phosphatases in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 275:6308–6312.
32. Ahmad, F. et al. (1995) Osmotic loading of neutralizing antibodies demonstrates a role for protein-tyrosine phosphatase 1B in negative regulation of the insulin action pathway. *J. Biol. Chem.*, 270:20503–20508.
33. Kenner, K.A. et al. (1996) Protein-tyrosine phosphatase 1B is a negative regulator of insulin and insulin-like growth factor-I-stimulated signalling. *J. Biol. Chem.*, 271:19810–19816.
34. Byon, J.C.H. et al. (1998) Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction. *Mol. Cell. Biochem.*, 182:101–198.
35. Zinker, B.A. et al. (2002) PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99:11357–11362.
36. Ferhatia, X., et al. (2019) Dual targeting of PTP1B and glucosidases with new bifunctional iminosugar inhibitors to address type 2 diabetes. *Bio. Chem.*, 87:534–549.
37. Elchebly, M. et al. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science.*, 283:1544–1548.
38. Zabolotny, J.M. et al. (2002) PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell.*, 2:489–495.
39. Cheng, A. et al. (2002) Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev. Cell.*, 2:497–503.

40. Bence, K.K. *et al.* (2006) Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.*, 12:917–924.
41. Hoekstra, E., *et al.* (2016). Increased PTP1B expression and phosphatase activity in colorectal cancer results in a more invasive phenotype and worse patient outcome. *Oncotarget*; 7:21922–38.
42. Julien, S. G. *et al.* (2007). Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat. Genet.*, 39(3):338-46.
43. Liu, H., *et al.* (2015). PTP1B promotes cell proliferation and metastasis through activating src and ERK1/2 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.*, 359:218–25.
44. Buckley, D. A., *et al.* (2002). Regulation of insulin-like growth factor type I (IGF-1) receptor kinase activity by protein tyrosin phosphatase 1B (PTP-1B) and enhanced suppression of apoptosis and motility in PTP-1B deficient fibroblasts. *Mol. Cell. Bio.*, 22(7):1988-2010.
45. Zhang, S. & Yu, D. (2012). Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: Turning promise into triumph. *Trends Pharmacol. Sci.*, 33:122-128.
46. Parsons, S. J. & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.*, 23:7906-7909.
47. Summy, J. & Gallick, G. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer metastasis Rev.*, 22:337-358.
48. Biscardi, J. S., *et al.* (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer: Epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2:203.
49. Lai, Y. H., *et al.* (2015). Rhodomycin A, a novel Src targeted compound, can suppress lung cancer cell progression via modulating Src-related pathways. *Oncotarget.*, 6:26252-26265.
50. Zhu, S., *et al.* (2007). PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res.*, 67:10129-10137.
51. Paladino, D., *et al.* (2016). A novel nuclear Src and p300 signaling axis controls migratory and invasive behavior in pancreatic cancer. *Oncotarget.*, 7:7253-7267.
52. Dube, N., *et al.* (2005). Genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p53-null mice through the regulation of B-cell development. *Cancer Res.*, 65:10088–95.
53. Lessard, L., *et al.* (2009). The two faces of PTP1B in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1804:613–619.
54. He, X. (2012). Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer. *Ann. Oncol.*, 23(7):1771-80.
55. Noto, H. *et al.* (2013). Latest insights into the risk of cancer in diabetes. *J. Diabetes Investig.*, 4(3):225-32.
56. Scheen, A. J. & Van Gaal, L. F. (2014). Combating the dual burden: therapeutic targeting of common pathways in obesity and type 2 diabetes. *Lancet. Diabetes Endocrinol.*
57. Sun, G. & Kashyap. (2011). Cancer risk in type 2 diabetes mellitus: metabolic links and therapeutic considerations. *J. Nutr. Metab.*, 2011:708183.

58. Jin, J., *et al.* (2019) Identification and Characterization of Potent and Selective Inhibitors Targeting Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B), *Bio. & Med. Chem. Lett.*
59. Verma, M., *et al.* (2017) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as antidiabetic agents – A brief review. *Bioor. Chem.*, 70:267–283.
60. Wang, L. J., *et al.* (2015) Natural and semisynthetic protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors as anti-diabetic agents. *Roy. Society Chem. Adv.*, 5:48822–48834.
61. Zhao, B. T., *et al.* (2017) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from natural sources. *Arch. Pharm. Res.*
62. Jiang, C. S., *et al.* (2012) Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades. *Acta Pharmacol. Sin.*, 33:1217–45.
63. Park, J. S., *et al.* (2019) New preaustinoids from a marine-derived fungal strain *Penicillium* sp. SF-5497 and their inhibitory effects against PTP1B activity. *J. of Antibio.*
64. Demers, D. H. (2017) Chemical Investigations of Fungal Natural Products for Drug Discovery. Graduate Theses and Dissertations. Descargado de: <http://scholarcommons.usf.edu/etd/6825>
65. Khan, R. A. (2018) Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharma. J.*, 26:739–753.
66. Nothias, L. F., *et al.* (2018) Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. *J. Nat. Prod.*, 81:758–767.
67. Hillman, E. T., *et al.* (2017) Exploiting the natural product potential of fungi with integrated -omics and synthetic biology approaches. *Curr. Opi. in Syst. Bio.*, 5:50–56.
68. Blackwell, M. (2011) The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *Am. J. Bot.*, 98:426–438.
69. Grigoriev, I. V., *et al.* (2014) MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.*, 42:D699–D704.
70. Hoffmeister, D. & Keller, N. P. (2007) Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.*, 24:393–416.
71. Gressler, M., *et al.* (2015) A new highperformance heterologous fungal expression system based on regulatory elements from the *Aspergillus terreus* terrein gene cluster. *Front. Microbiol.*, 6:184.
72. Chai, H., *et al.* (2016) Sesterterpene ophiobolin biosynthesis involving multiple gene clusters in *Aspergillus ustus*. *Sci. Rep.*, 6:27181.
73. González-Medina, M., *et al.* (2016) Chemoinformatic expedition of the chemical space of fungal products. *Future Med. Chem.*, 8(12): 1399-1412.
74. González-Medina, M., *et al.* (2017) Scaffold diversity of fungal metabolites. *Front. Pharmacol.*, 8: 180.
75. Sohn, J. H., *et al.* (2013) PTP1B inhibitory secondary metabolites from marine-derived fungal strains *Penicillium* sp. and *Eurotium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23:1206–1211.
76. Seo, C., *et al.* (2009) Isolation of the protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory metabolite from the marine-derived fungus *Cosmospora* sp. SF-5060. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*, 19:6095–6097.
77. Debbab, A., *et al.* (2010) Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microb. Biotechnol.*, 3:544–563.

78. Quang, T. H., et al. (2014) Tanzawaic acid derivatives from a marine isolate of *Penicillium* sp. (SF-6013) with anti-inflammatory and PTP1B inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24:5787–5791.
79. Wang, Y., et al. (2007) Structures, biogenesis, and biological activities of pyrano[4,3-c]isochromen-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*. *J. Nat. Prod.*, 70:296–299.
80. Ai, W., et al. (2014) Guignardins A-F, spirodioxynaphthalenes from the endophytic fungus *Guignardia* sp. KcF8 as a new class of PTP1B and SIRT1 inhibitors. *Tetrahedron*. 70:5806–5814.
81. Liu, L., et al. (2015) Structure and biosynthesis of fumosorinone, a new protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor firstly isolated from the entomogenous fungus *Isaria fumosorosea*. *Fungal Genet. Biol.*, 81:191–200.
82. Ren, J., et al. (2017) Bioactive Azaphilone Derivatives from the Fungus *Talaromyces aculeatus*. *J. Nat. Prod.*, 80:2199–2203.
83. Chaiyosanga, B., et al. (2019) Bioactive oxaphenalenone dimers from the fungus *Talaromyces macrosporus* KKU-1NK8. *Fitoterapia*. 134:429–434.
84. Tsang, C. C., et al. (2018) Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Comp. & Struc. Biotech. J.*, 16:197–210.
85. Stolk, A. C. & Samson, R. A. (1972) The genus *Talaromyces*. Studies on *Talaromyces* and related genera II. *Stud. Mycol.*, 2:1–65.
86. Yaguchi, T., et al. (1996) A reappraisal of intrageneric classification of *Talaromyces* based on the ubiquinone systems. *Mycoscience*. 37(1):55–60.
87. Yilmaz, N., et al. (2014) Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud. Mycol.*, 78:175–341.
88. Zhai, M. M., et al. (2016) The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species. *Nat. Prod. Bioprospect*. 6:1–24.
89. Chu, Y. S., et al. (2010) Isolation of putative biosynthetic intermediates of prenylated indole alkaloids from a thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Org. Lett.*, 12(19):4356–4359.
90. Yang, H.B., et al. (2015) Alkaloids from an algicolous strain of *Talaromyces* sp. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 34:367–371.
91. Niu, X. M., et al. (2014) Characterization of Thermolide Biosynthetic Genes and a New Thermolide from Sister Thermophilic Fungi. *Org. Lett.*, 16(14):3744–3747.
92. Ngokpol, S., et al. (2015) Drimane Sesquiterpene-Conjugated Amino Acids from a Marine Isolate of the Fungus *Talaromyces minioluteus* (*Penicillium Minioluteum*). *Mar. Drugs*. 13(6):3567–3580.
93. Dong, Y. S., et al. (2006) Wortmannilactones A–D, 22-Membered Triene Macrolides from *Talaromyces wortmannii*. *J. Nat. Prod.*, 69(1):128–130.
94. Wang, H., et al. (2001) Isolation, structural identification of FKI-0076E2, an unstable macrocyclic poly lactones from *Talaromyces* sp. FKI-0076. *Chin. J. Antibiot.*, 26(2):89–93.
95. Yamazaki, M. & Okuyama, E. (1980) Isolation and structures of oxaphenalenone dimers from *Talaromyces bacillosporus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 28(12):3649–3655.



96. Wu, B., *et al.* (2015) Acetylcholinesterase inhibitors from a marine fungus *Talaromyces* sp. strain LF458. *Mar. Biotechnol.* 17(1):110–119.
97. Hayashi, H., *et al.* (2012) A New Meroterpenoid, Chrodriamanin C, from YO-2 of *Talaromyces* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(4):745–748.
98. Komai, S. I., *et al.* (2004) A new funicone derivative isolated from *Talaromyces flavus*. *Mycotoxins* 54(1):15–19.
99. Fujimoto, H., *et al.* (1990) Two new fungal azaphilones from *Talaromyces luteus*, with monoamine oxidase inhibitory effect. *Heterocycles.*, 30(1):607–616.
100. Kimura, T., *et al.* (2008) Novel azaphilones, kasanosins A and B, which are specific inhibitors of eukaryotic DNA polymerases beta and lambda from *Talaromyces* sp. *Bioorg. Med. Chem.*, 16(8):4594–4599.
101. Bara, R., *et al.* (2013) Antibiotically active metabolites from *Talaromyces wortmannii*, an endophyte of *Aloe vera*. *J. Antibiot.*, 66(8):491–493.
102. Bara, R., *et al.* (2013) Atropisomeric dihydroanthracenones as inhibitors of multiresistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Chem.*, 56(8):3257–3272.
103. Matsunaga, H., *et al.* (2015) Isolation and structure of vanitaracin A, a novel anti-hepatitis B virus compound from *Talaromyces* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25(19):4325–4328.
104. Liu, F., *et al.* (2010) The bioactive metabolites of the mangrove endophytic fungus *Talaromyces* sp. ZH-154 isolated from *Kandelia candel*. *Planta Med.*, 76(2):185–189.
105. Li, H. X., *et al.* (2011) Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala*. *J. Nat. Prod.*, 74(5):1230–1235.
106. Shiozawa, H., *et al.* (1995) Trachyspic acid, a new metabolite produced by *Talaromyces trachyspermus*, that inhibits tumor cell heparanase: taxonomy of the producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation, and biological activity. *J. Antibiot.*, 48(5):357–362.
107. Singh, S. B., *et al.* (2003) Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30(12):721–731.
108. Zhai, M. M., *et al.* (2015) Talaromycolides A-C, Novel Phenyl-Substituted Phthalides Isolated from the Green Chinese Onion-Derived Fungus *Talaromyces pinophilus* AF-02J. *Agric. Food Chem.*, 63(43):9558–9564.
109. Takeuchi, M., *et al.* (1989) Fosfonochlorin, a new antibiotic with spheroplast forming activity. *J. Antibiot.*, 42(2):198–205.
110. Gombodorj, S., *et al.* (2017) New phenalenone derivatives from *Pinellia ternata* tubers derived *Aspergillus* sp. *Fitoterapia.*, 120:72–78.
111. Zang, Y., *et al.* (2016) Antimicrobial Oligophenalenone Dimers from the Soil Fungus *Talaromyces stipitatus*. *J. Nat. Prod.*, 79:2991–2996.
112. Tansakul, C., *et al.* (2014) A new phenalenone derivative from the soil fungus *Penicillium herquei* PSU-RSPG93, *Nat. Prod. Res.*, 28(20):1718–1724.
113. Li, Y., *et al.* (2017) Anti-Cryptococcus Phenalenones and Cyclic Tetrapeptides from *Auxarthron pseudauxarthron*. *J. Nat. Prod.*, 80:2101–2109.

114. Gao, S. S., *et. al.* (2018) Biosynthesis of Heptacyclic Duclauxins Requires Extensive Redox Modifications of the Phenalenone Aromatic Polyketide. *J. Am. Chem. Soc.*, 140:6991–6997.
115. Elsebai, M. F., *et. al.* (2013) Fungal phenalenones: chemistry, biology, biosynthesis and phylogeny. *Nat. Prod. Rep.*, 31:628.
116. Barton, D. H. R., *et. al.* (1959) The constitutions of atrovenetin and of some related herqueinone derivatives. *Tetrahedron*, 6:48–62.
117. Narasimhachari, N., *et. al.* (1963) The production of antibiotic atrovenetin by a strain of *Penicillium herquei*. *Can. J. Microbiol.*, 9:134–136.
118. Ishikawa, Y., *et. al.* (1991) Flavoglucin, a metabolite of *Eurotium chevalieri*, its antioxidation and synergism with tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(9):666–668.
119. Tabata, N., *et. al.* (1998) Erabulenols, Inhibitors of Cholesteryl Ester Transfer Protein Produced by *Penicillium* sp. FO-5637. *J. Antibiot.*, 51(7):624–628.
120. Tomoda, H., *et. al.* (1998) Inhibitors of Cholesteryl Ester Transfer Protein Produced by *Penicillium* sp. *Antibiot.*, 51(7):618–623.
121. Elsebai, M. *et. al.* (2013). Fungal phenalenones: chemistry, biology, biosynthesis and phylogeny. *Nat. Prod. Rep.* 31: 628.
122. Xiao, J. Z., *et. al.* (1993) Rousselianone A, novel antibiotic related to phenalenone produced by *Phaeosphaeria rousseliana*. *J. Antibiot.*, 46(10):1570–1574.
123. Nakanishi, S., *et. al.* (1995) Isolation of myosin light chain kinase inhibitors from microorganisms: dehydroaltenusin, altenusin, atrovenetinone, and cyclooctasulfur. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 59(7):1333–1335.
124. Shiomi, K., *et. al.* (2005) Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase. *J. Antibiot.*, 58(1):65–68.
125. Ayer, W. A., *et. al.* (1987) Metabolites produced by the scleroderris canker fungus. *Can. J. Chem.*, 65(4):748–753.
126. Ayer, W. A., *et. al.* (1989) *Can. J. Chem.*, 67(12):2089–2094.
127. Perpelescu, M., *et. al.* (2002) Novel phenalenone derivatives from a marine-derived fungus exhibit distinct inhibition spectra against eukaryotic DNA polymerases. *Biochemistry*, 41(24):7610–7616.
128. Elsebai, M. F., *et. al.* (2011) Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. *Org. Biomol. Chem.*, 9:802–808.
129. Shibata, T., *et. al.* (1989) A new immunomodulator FR-901235. *J. Antibiot.*, 42(9):1356–1361.
130. Ayer, W., Van Altena, I., *et. al.* (1982) *Cancer. Rev. Lat. Quím.* 13(3/4):84–87.
131. Dethoup, T., *et. al.* (2005) Bacillisporins D and E, new oxyphenalenone dimers from *Talaromyces bacillisporus*. *Planta Med.* 72(10):957–960.
132. Ayer, W. A., Ma, Y. T. (1992) *Can. J. Chem.*, 70(7):1905–1913.
133. Bachmann, O., *et. al.* (1986) The green pigment from the fungus *Roesleria hipogea*. *Ann. Chem.*
134. Julianti, E., *et. al.* (2013) *Org. Lett.*, 15(6):1286–1289.
135. Li, X., *et. al.* (2016) The design strategy of selective PTP1B inhibitors over TCPTP. *Bioorg. & Med. Chem.*, 24: 3343-3352.

136. Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79:629–661.
137. Kuhr, I. & Fuska, J. (1973). An antitumor antibiotic produced by *Penicillium stipitatum*; it's identity with duclauxin. *J. of Antibio.*, 26(9).
138. Ogihara, Y., et al. (1966). On metabolites of *Penicillium duclauxi* Delacroix –III. The reactions of duclauxin with ammonia and primary amines. The srtructures of desacetylduclauxin, neoclauxin, xenoclauxin and cryptoclauxin. *Tetrahedron Lett.* 25:2867-2873.
139. Brooks, H. B., et al. (2012) Basics of Enzymatic Assays for HTS. *Assay Guidance Manual*.
140. Motulsky, H. J. (2016). Mixed-model inhibition. GraphPad Curve Fitting Guide. Descargado de: [https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg\\_mixed\\_model.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg_mixed_model.htm)
141. Jakubowski, H. (2017). Biochemistry Online – An approach base don Chemical Logic. Chapter 6 Transport and kinetics. Descargado de: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A\\_Biochemistry\\_Online\\_\(Jakubowski\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Online_(Jakubowski))
142. Brandão-A. S., T., et al. (2010) Insights into the reaction of protein-tyrosine phosphatase 1B: crystal structures for transition state analogs of both catalytic steps. *The J. of Bio. Chem.*, 285(21): 15874-15883.
143. Makeneni, S., et al. (2018) Applying pose clustering and MD simulations to eliminate false positives in molecular docking. *J. Chem. Inf. Model.*, 58(3): 605-614.
144. Schrödinger, LLC. (2010) Induced Fit Docking Manual. Descargado de: [https://isp.ncifcrf.gov/files/isp/uploads/2010/07/ifd09\\_user\\_manual.pdf](https://isp.ncifcrf.gov/files/isp/uploads/2010/07/ifd09_user_manual.pdf)
145. Kenakin, T. P. (2012). Enzymes as Drug Targets. *Pharm. Drug Dis.* 105-124.
146. Bertrand, S., et al. (2013) De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *J. Nat. Prod.*, 76:1157–1165.
147. Nielsen, M. L., et al. (2017) Genes Linked to Production of Secondary Metabolites in *Talaromyces atrovirens* Revealed Using CRISPR-Cas9. *PLoS ONE.*, 12(1): e0169712.
148. Lyu, H. N., et al. (2018) Harnessing diverse transcriptional regulators for natural product discovery in fungi. *Nat. Prod. Rep.*
149. Loria, G., et al. (2019) Honey extracts inhibit PTP1B, upregulate insulin receptor expression, and enhance glucose uptake in human HepG2 cells. *Biomed. & Pharmacother.*, 113:108-752.
150. Wubshet, S. G., et al. (2016) Identification of PTP1B and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Serrulatanes from *Eremophila* sp. by Combined use of Dual High-Resolution PTP1B and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Profiling and HPLC-HRMS-SPENMR. *J. Nat. Prod.*, 79:1063–1072.
151. Wang, J., et al. (2017) Meroterpenoids with Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity from a *Hyrtios* sp. Marine Sponge. *J. Nat. Prod.*, 80:2509–2514.
152. Pang, X., et al. (2017) Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Aspergillus* sp. CPGC 400735 and Their Anti-HIV Activities. *J. Nat. Prod.*, 80:2595-2601.
153. Thuy Hoang, T. P., et al. (2018) Metabolomics-Driven Discovery of Meroterpenoids from a Mussel-Derived *Penicillium ubiquestum*. *J. Nat. Prod.*, 81:2501–2511.

154. Cao, P., et. al. (2015) New Duclauxamide from *Penicillium manginii* YIM PH30375 and Structure Revision of the Duclauxin Family. *Org. Lett.*, 17:1146–1149.
155. Intaradom, C., et. al. (2015) Phenalenone derivatives and the unusual tricyclic sesterterpene acid from the marine fungus *Lophiostoma bipolare* BCC25910. *Phytochem.*, 120:19–27.
156. Nazir, M., et. al. (2015) Phenalenones: insight into the biosynthesis of polyketides from the marine alga-derived fungus *Coniothyrium cereale*. *Org. Biomol. Chem.*, 13:8071–8079.
157. Tautz, L., et. al. (2013) Protein Tyrosine Phosphatases: Structure, Function, and Implication in Human Disease. Phosphatase Modulators. *Met. Mol. Bio.*, 1053(13).
158. Skellam, E. (2019) Strategies for Engineering Natural Product Biosynthesis in Fungi. *Trend. Biotech.*, 37(4).
159. Zhao, Y., et. al. (2019) Synthesis, biological evaluation, and molecular docking study of novel allylretrochalcones as a new class of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *Bioor. & Med. Chem.*, 27:963–977.
160. Ardito, F., et. al. (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 40:271-280.
161. Harvey, A. L., et. al. (2015) The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 14(2):111-29.
162. Lee, D. S., et. al. (2013). PTP1B Inhibitory and Anti-Inflammatory Effects of Secondary Metabolites Isolated from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. JF-55. *Mar. Drugs*, 11:1409-1426.
163. Frigolet, M. E. (2006) Señalización de la leptina. *Rev. Edu. Bioquím.* 25(2):50-54.
164. Olivares, J. A. & Arellano, A. (2008) Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev. Edu. Bioquím.* 27(1):9-18
165. Soto, G., et. al. (2017) Trends in frequency of type 2 diabetes in Mexico and its relationship to dietary patterns and contextual factors. *Gac. San.* 32(3):283-290.
166. Sun, L. Y., et. al. (2010) *Chin. Chem. Lett.*, 21(7):842–845.
167. Nielsen, K. F., et. al. (2011). Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J. Nat. Prod.*, 74:2338–2348.
168. Yip, S. C., et. al. (2010). PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. *Trends Biochem. Sci.*, 35(8):442-9.
169. Bentires-Aalj, M. & Neel, B. G. (2007). Protein-tyrosine phosphatases 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res.*, 67(6):2520-4.