

TESIS DOCTORAL

Efecto antitumoral, anti VIH y elucidación estructural de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de Satipo y Pucallpa

Lucy Ibáñez Vásquez*

RESUMEN

Se evaluó la actividad antitumoral y antiviral de los extractos al 10% p/v de hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* Cambess de Satipo y Pucallpa. Se utilizaron técnicas del CYTED, Skehan y Simmons.

En *Artemia salina* la CL50 fue 70,5 ppm, con un límite superior e inferior al 95% de 136,50ppm y de 36,4 ppm por Probits, asimismo se observó una inhibición sobre líneas celulares tumorales: U251 (cáncer del SNC), PC-3 (cáncer de próstata), HCT15 (cáncer de colon), MCF7 (cáncer de mama) y K562 (cáncer de tejido linfoide) de 109,42%, 95,67%, 96,16%, 102,68% y 95,69% respectivamente, con una $p < 0,01$. En la evaluación antimutagénica en cebolla, al cabo de 6 horas el IM de las células meristemáticas decreció de 13 a 1,0 a la concentración de 0,5% a 25°C. La actividad antiviral sobre la Transcriptasa Reversa (RT) del VIH-1, realizada con el Kit Lenti RT, presentó una CL50 de 70,2905 ug/ml (límites al 95%: 138,89ug/ml-35,5707ug/ml). Se detectó: alcaloides, cumarinas, lactonas, triterpenos pentacíclicos, habiéndose aislado tres compuestos CbHS5, CbHS16, CbHS525354, realizándose la elucidación estructural de los dos componentes mayoritarios por RMNH1, RMNC13 y Espectrometría de Masas que fueron caracterizados como *Betulina*, que posee un efecto antiinflamatorio y el *Ácido betulínico*, que posee efectos antitumoral y anti-VIH.

La *Betulina* y del *Acido betulínico* podrían estar implicados en la acción farmacológica del extracto de hojas de Satipo, que presentó un buen efecto antitumoral y antiviral de 72,05% sobre la RT, frente a Nevirapine utilizado en la terapia de pacientes con SIDA, que presentó 71,59%.

Palabras clave: antitumoral, antiviral, SIDA, VIH-1, *Calophyllum brasiliense*, Lagarto caspi, Bari, Santa María, cáncer.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos sintéticos y de origen natural para combatir una serie de enfermedades como cáncer y SIDA se ha convertido en una preocupación que deriva en un esfuerzo emprendido por instituciones universitarias y compañías farmacéuticas a nivel mundial. Las plantas son una fuente importante en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de una serie de enfermedades. Por ello es necesario desarrollar ventajas competitivas en la industrialización de productos naturales a través de alianzas entre universidades, empresas, gobiernos e instituciones nacionales y extranjeras, y emprender esfuerzos para lograr avances en la Investigación y Desarrollo, a fin de detectar posibilidades de aplicarse con éxito a nivel comercial y cubrir nuevas demandas del mercado nacional e internacional con especies promisorias, generando invenciones que pueden dar lugar a un producto o un procedimiento que cumpla con los requisitos de: a) novedad, b) nivel inventivo y c) aplicabilidad industrial.

Los métodos de cultivos de células y tejidos in vitro, se emplean cada vez con mayor frecuencia en el estudio de compuestos, teniendo en cuenta el código de ética animal y con la finalidad de evaluar mecanismos de acción, aunque su valor es limitado.

Desde que se identificó el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) como el agente causal del SIDA (1,2), la búsqueda de tratamientos efectivos en la prevención y desarrollo de esta enfermedad ha

* Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres

sido el principal objeto de estudio. Los productos naturales también han contribuido al descubrimiento de agentes anti VIH-1 (3), mediante sondeos o screenings masivos biodirigidos. Como resultado de dichos estudios, a la fecha se ha logrado identificar más de 60 productos naturales anti VIH (4) que no sólo proporcionan entidades químicas potencialmente útiles en el tratamiento del SIDA, sino que además constituyen moldes para el diseño de nuevos fármacos. A principios de 1997 y según datos del programa HIV-AIDS de Naciones Unidas, la cifra de personas afectadas en el mundo por el VIH era de 21,8 millones (de las cuales, 21 millones eran adultos y 830 000 niños). El VIH pertenece al grupo de los lentivirus o retrovirus citopáticos no transformantes y hasta el momento se ha aislado dos subtipos capaces de provocar la enfermedad: VIH-1 y VIH-2. El VIH-2 está limitado fundamentalmente a África occidental y causa una mínima proporción de los casos de SIDA; por el contrario, el VIH-1 se encuentra diseminado mundialmente y es el agente causal de la mayoría de casos de SIDA, por lo que habitualmente se nombra como agente etiológico de la infección por VIH.

Los antirretrovíricos no son curativos, pues no erradican la infección, pero pueden disminuir la viremia y retrasar la depresión inmunitaria, para convertir la infección por VIH en una enfermedad crónica controlada, para lo cual el tratamiento debería ser potente e iniciarse de forma precoz. La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa es una enzima exclusiva de los retrovirus, por lo que su inhibición afecta sólo el ciclo evolutivo del VIH y no al de la célula hospedera. Básicamente pueden diferenciarse dos grupos de medicamentos antirretrovíricos según el mecanismo de acción sobre el ciclo evolutivo del VIH, a) inhibidores de la transcriptasa inversa y b) inhibidores de la proteasa vírica.

Las estrategias científicas para la evaluación in vitro de productos naturales con actividad biológica han cambiado con el paso de los años; un desarrollo reciente es la investigación altamente automatizada de las pruebas biológicas basadas en métodos colorimétricos que cuantifican la proliferación de los cultivos celulares (5-6). Estas técnicas son consideradas rápidas y baratas para la evaluación antitumoral (7) y antiviral (8) de una gran cantidad de extractos de productos naturales; estos métodos

permiten fácilmente dirigir el aislamiento y purificación de los principios activos (9). Diversos procesos moleculares en el ciclo viral han sido identificados como blanco de acción de posibles fármacos como: las enzimas transcriptasa reversa (TR), proteasa (PR) e integrasa (IN) (10), así como proteínas involucradas en la adhesión y fusión del virus (11). La TR es una enzima esencial en la replicación del VIH, ya que transcribe el material genético del virus constituido por una cadena sencilla de RNA en una cadena doble de DNA (12).

El Nevirapine es conocido como Viramune, se presenta en comprimidos de 200 mg, la dosis usual es 200 mg/día y es administrada por vía oral, es un inhibidor específico y no competitivo de la transcriptasa inversa del VIH-1. Se une directamente a la transcriptasa inversa vírica y bloquea la actividad ADN-polimerasa dependiente tanto del ARN como del ADN al alterar el sitio catalítico de la enzima. Después de su administración oral con o sin alimentos, se absorbe con rapidez (biodisponibilidad del 95%). Se une moderadamente a las proteínas plasmáticas (60%) y alcanza concentraciones plasmáticas máximas al cabo de 2-4 horas, con una semivida de 45h. Se metaboliza en el hígado a través del Citocromo P-450 y se elimina mayoritariamente por la orina (84%) en forma de metabolitos. Atraviesa la barrera hematoencefálica y la placenta y se excreta en la leche materna. Presenta erupción cutánea intensa en el síndrome de Stevens-Johnson, siendo grave en algunos casos, con estomatitis ulcerativa, cefalea, náuseas, vómitos, diarrea, somnolencia, fiebre, etc.

Cáncer es un conjunto de enfermedades en que las células dañadas genéticamente proliferan de forma autónoma. Estas células no pueden responder a los mecanismos reguladores normales para asegurar la cooperación intercelular que se requiere en los organismos multicelulares. Por consiguiente, continúan proliferando y de esta forma robando a las células normales los nutrientes y finalmente invadiendo los tejidos sanos de los alrededores. Dependiendo del daño originado, las células anormales pueden formar tumores benignos o malignos. Los tumores benignos que son de crecimiento lento y limitado a una localización específica no se consideran cancerosos y en pocas ocasiones producen la muerte. Por el contrario, los

malignos suelen ser fatales debido a que pueden experimentar metástasis (las células cancerosas emigran a través de la sangre o vasos linfáticos a lugares distintos del cuerpo). Al surgir los nuevos tumores malignos, interfieren con las funciones normales y cuando los procesos que mantienen la vida fallan los pacientes mueren.

El género *Calophyllum* es el más importante miembro de la familia *Clusiaceae*, (*Guttiferae*); está constituido por 187 especies, todas ellas árboles tropicales. La mayoría (179) se encuentra en el viejo mundo en especial en la zona Indo-Malasia con extensión hacia las islas Madagascar y Fuji. Se estima que sólo 8 especies se distribuyen en el continente americano, desde México hasta las Antillas y Centro América, Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia, Brasil y las Guyanas. Este género se encuentra básicamente restringido a selvas húmedas, en tierras bajas, colinas y a veces en bosques de montaña, aunque algunas especies crecen en hábitats secos. De este género se han aislado otras moléculas, tales como las xantonas, las cuales han mostrado actividad citotóxica, actividad antiviral VIH y antibacteriana por lo que estas moléculas también son candidatos potenciales para su evaluación como fármacos antineoplásicos y antibacterianos, además de constituir moldes para el diseño de nuevos fármacos, atribuyéndose dicha actividad citotóxica a que actúan como bloqueadores del ciclo celular en la fase G₂/M. Los mecanismos de acción de las xantonas no se conocen, sin embargo se sabe que inhiben la síntesis de DNA, RNA y proteínas y aumentan el índice mitótico en la metafase.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de la zona de Satipo fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones Farmacéuticas Illary y la de Pucallpa por Pebani-Inversiones S.A, identificándose taxonómicamente, luego fueron estabilizadas y se sometieron a una maceración a temperatura ambiente con Metanol Q.P a una concentración al 10% p/v por una semana; posteriormente se filtraron y los extractos fueron concentrados al vacío en un rotavapor hasta la total eliminación del solvente, obteniéndose un residuo seco. El screening fitoquímico preliminar se realizó de acuerdo al método descrito por Ciulei. Del

extracto metanólico que presentó mejor actividad biológica se procedió a la separación de los principios activos por métodos convencionales de cromatografía en columna obteniéndose: CbHS5, CbHS16 y CbHS525354. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMNH1) y los espectros de carbono (RMN13 C) se obtuvieron en el Instituto de Química de la UNAM (MEXICO) y en el Departamento de Farmacia de la USAL (España).

Evaluación de la actividad citotóxica en *Artemia salina* según Anderson, Meyer, Thompson (CYTED, 1995). Se siguió el procedimiento siguiente:

Día 1: Se preparó agua de mar (3,8 g de sal de mar comercial en 100ml de agua destilada). Se filtró. Se colocaron aproximadamente 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un Erlenmeyer con 350 ml de agua de mar. Se les colocó en un lugar con luz artificial o natural y con una bomba de oxígeno con burbujeo lento.

Día 2: Se transfirió la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con agua fresca. Se pesó 20 mg de *Calophyllum brasiliense*.

Día 3: Se disolvió 20 mg de la muestra en 2 ml de disolvente, 0,5 ml de DMSO y 1,5 ml de agua destilada (lo que hizo un total de 2 mL). A partir de esta solución, se prepararon diluciones de 1 000, 100 y 10 ppm transfiriendo a cada vial 500, 50, y 5 ul respectivamente. Siendo 3 viales por cada concentración (9 en total). Se hizo un control por muestra. Como la muestra fue apolar se le agregó al control 50ul de DMSO. Los nauplios estuvieron listos para el ensayo. A cada vial se le agregaron 10 nauplios (30 nauplios por dilución) y la dilución del extracto requerido. Luego, se agregó agua de mar hasta completar 5 mL por vial. A cada vial se le agregó además, una gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura seca se disuelven en 5 mL de agua de mar como alimento).

Día 4: Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución. Se analizaron los datos con el programa de computadora Finney (DOS) para determinar valores CL₅₀.

Evaluación de la actividad citotóxica de sustancias sobre la proliferación de células cancerosas de humano según el Método de la Sulforodamina B (Skehan, 1990). Se utilizaron los extractos metanólicos de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* y se hicieron los ensayos en placas de 96 pozos para determinar la viabilidad celular, el cual es un ensayo colorimétrico que se leyó en un lector de ELISA a 515 nm. Se utilizó como controles positivos 5-Fluororacilo y adriamicina. Todos los compuestos fueron disueltos en DMSO, a una concentración máxima del 0,5% v/v; las pruebas se realizaron en 5 líneas celulares: U-251 (carcinoma del sistema nervioso central), PC-3 (carcinoma de próstata), K562 (leucemia megaloblástica, linfoma), HCT-15 (cáncer de colon) y MCF-7 (cáncer de mama).

Día 1: Se tomaron las placas de crecimiento celular en el cual se observaron una confluencia de 70-80%. Se contaron las células par obtener una solución de 5×10^4 células/ml. Se inocularon dos placas con 100 ul de la solución anterior de células (5×10^4 células/ml). Se incubaron 37° C en 4,5% de CO₂.

Día 2: A las 24 horas se añadió 100 ul de medio a la denominada placa cero y después se fijó con 50 ul de una solución de TCA (ácido tricloroacético) al 50% durante 1 hora a 4° C. Transcurrida la hora se lavaron con agua corriente de la llave 5 veces, se dejó secar a temperatura ambiente y se guardó en refrigeración. En la(s) placa experimental se añadió 100 ul de la(s) dilución(s) de la(s) sustancia a probar y se incubó durante 48 horas.

Día 4: La placa experimental se fijó con 50 ul de una solución de TCA al 50% y se procedió igual que en la placa cero.

Día 5: Las placas cero y experimental se tiñeron con 100 ul de una solución de sulforrodamina B al 0,4% en ácido acético al 1% durante 30 min. Se lavaron con una solución al 1% de ácido acético 5 veces y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Día 6: Se adicionó 100 ul de TRIS base (pH 10) y se agitó. Se midió la densidad óptica a 515 nm en un lector de placas. Y con los datos de densidad óptica se calcularon % de inhibición

y/o IC₅₀ con respecto al control. Para determinar el % de inhibición se aplicaron las siguientes fórmulas según fue el caso.

$100 \times (T - T_0) / (C - T_0)$ cuando T es igual o > a T₀ ó

$100 \times (T - T_0) / T_0$ cuando T es < a T₀

C= Densidad óptica del control

T= Densidad óptica del tratamiento. T₀= Densidad óptica de la placa cero.

Evaluación de la actividad antimitótica en el modelo de ciclo celular de *Allium cepa* según De La Torre (13). Para ello se cogieron los bulbos seleccionados, con raíces de 2 a 3cm de longitud, los cuales fueron mantenidos en agua aireada constantemente y en oscuridad a 20° C (+/-0,5° C); durante el lapso de 2, 4, 6 horas y fueron sumergidos en varias concentraciones de los extractos para evaluar el índice mitótico y el índice de fases (profase, metafase, anafase y telofase) de la población meristemática.

Evaluación de la actividad antiviral (14-16):

La actividad inhibitoria sobre la TR VIH-1 se realizó mediante el kit Lenti-RT (Cavidi-Tech), método propuesto por Shao et al (1997). Dicho ensayo es inmunológico-colorimétrico, que consistió en determinar la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdUtp) a un molde de poliadenina (PolyA) cuya reacción fue catalizada por la adición de una transcriptasa reversa recombinante de VIH-1, así como una secuencia iniciadora o primer. La bromodesoxiuridina unida al molde fue reconocida por un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina. La adición del paranitrofenilfosfato ocasionó que la fosfatasa hidrolizara el grupo fosfato a paranitrofenil, provocando una reacción colorida que se leyó a 405 nm.

RESULTADOS

Se observó para el extracto metanólico de las hojas de Satipo un buen efecto citotóxico en el bioensayo en *Artemia salina* con una CL₅₀ (concentración letal media) = 70,5 ppm, con un límite superior e inferior al 95% de 136,50ppm y de 36,4 ppm de acuerdo al método de Probits, observándose una inhibición sobre líneas celulares tumorales

U251, PC-3, HCT15, MCF7 y K562 de 109,42%, 95,67%, 96,16%, 102,68% y 95,69% respectivamente, con una $p < 0,01$. En la evaluación antimitótica en cebolla, al cabo de 6 horas de tratamiento el índice

mitótico de las células meristemáticas decreció de un $IM = 13$ del control a un $IM = 1,0$ a la concentración de 0,5% a 25° C (Figura 1).

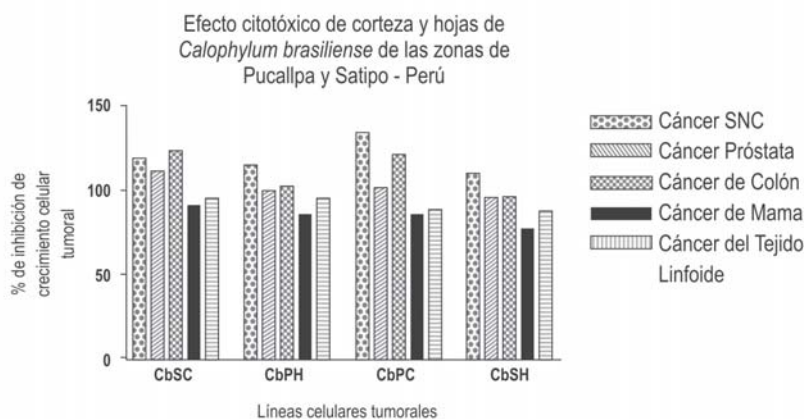


Figura 1. Actividad antitumoral de *Calophyllum brasiliense*

La actividad antiviral sobre la Transcriptasa Reversa (RT) del VIH-1, realizada con el Kit Lenti RT (Cavidi Tech), presentó una CL_{50} de 70,2905 $\mu\text{g/ml}$ con un límite superior e inferior al 95% de 138,89 $\mu\text{g/ml}$ y 35,5707 $\mu\text{g/ml}$. Asimismo en el extracto se observó la presencia de alcaloides, cumarinas, lactonas, triterpenos, entre otros, habiéndose aislado tres compuestos: de las fracciones 5 y 16 dos compuestos CBHS5, CbHS16

y de la fracción 52 se obtuvo el compuesto cristalino CbHS525354 de punto de fusión = 286° C; además de alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros. Los estudios de elucidación estructural por RMNH1, RMNC13 y Espectro de Masas de los componentes mayoritarios han demostrado la presencia de Betulina, agente antiinflamatorio y del Acido Betulínico, agente antitumoral y anti VIH (Figura 2).

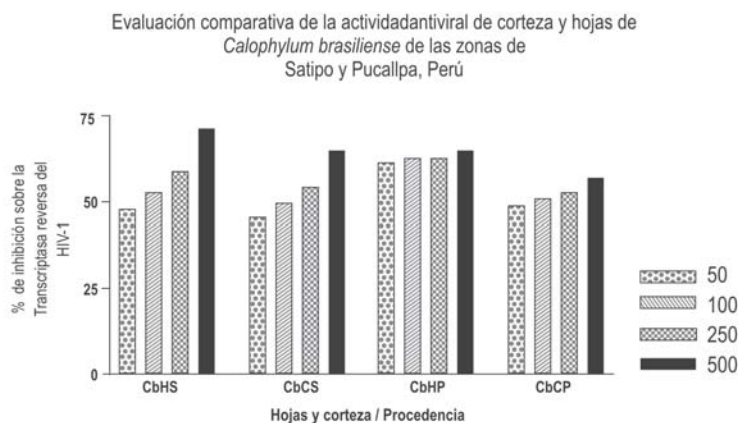


Figura 2. Actividad anti VIH de *Calophyllum brasiliense*

DISCUSIÓN

Según Tan GT, Pezzuto JM y Kinghorn AD (17) para considerar los extractos activos contra el VIH-1, éstos deben presentar un porcentaje de inhibición > 70% y con base en este criterio la especie analizada cumplió con este requisito, a diferencia de los resultados obtenidos para los extractos de hojas (65,45%) y corteza obtenida de la zona de Pucallpa, los cuales presentaron ligeras variaciones tal y como se observa en los resultados, mencionándose que la existencia de diferencias químicas en poblaciones de la misma especie es interesante desde el punto de vista farmacológico como se ha observado en la presente investigación.

De acuerdo a lo señalado por Kusumoto (18) y Cordell (9) la selección de los extractos crudos de la planta en investigación, tiene el potencial de ser más acertada en sus pasos iniciales, que la investigación de los compuestos puros aislados de productos naturales; considerando que la actividad de una droga no va a ser exactamente igual que la de su principio activo aislado y que los efectos de ciertas drogas o extractos se deben a la coexistencia de varios de sus constituyentes químicos que en conjunto son responsables de su actividad, sugiriéndose que los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de las plantas utilizadas en medicina tradicional son fuentes potenciales de agentes antivirales y antitumorales como lo menciona Chung (19).

Por ello creemos que los compuestos mayoritarios Betulina y Acido Betulínico podrían estar implicados en la acción farmacológica antitumoral, antiinflamatoria y antiviral. Podemos concluir que el extracto de *Calophyllum brasiliense* de la zona de Satipo presenta un buen efecto citotóxico, antitumoral, antimetabólico y antiviral sobre el virus del SIDA, siendo indispensable proseguir con las pruebas farmacológicas pertinentes para garantizar la eficacia farmacológica preclínica y clínica en el sentido de utilizarlo como criterio de calidad en la terapia clínica.

Agradecimiento

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Mg. María T. Ramírez (UNAM-MEXICO), al Dr. Arturo San

Feliciano M. y Dra. Pilar Puebla Ibáñez (USAL-ESPAÑA), a los Drs. Manuel Palomino Yamamoto, Pablo Bonilla Rivera (UNMSM) y Benjamín Castañeda C. (USMP) y a todos aquellos que hicieron posible la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20; 220 (4599):868-71.
2. Gallo, RC. *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984, 224: 500-503.
3. Colegate SM, Molyneux RJ. Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. CRC Press. 2000.
4. Vlietnick A.J, De Bruyne T, Apers S, Pieters LA. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Med*. 1998; 64:97-109.
5. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular grow and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 1983, 65:55-63.
6. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell grow and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth*.1986, 89: 271-277.
7. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 1987, Vol 47, N° 4, pp. 936-942.
8. Weislow OW, Kiser R, Fine DL, Bader J, Shoemaker RH, Boyd MR . New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *Journal of the National Cancer Institute*,1989. Vol 81, N° 8, 577-586.
9. Cordell GA. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* . Vol. 40. N° 6. Diciembre 1995, pp 1585-1612(28).
10. Huang T. B. Antihuman immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis

- on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences* 1997. 61(10):933-949.
11. Blair WS, Lin PF, Meanwell NA, Wallace OB. HIV-1 entry-an expanding portal for drug discovery. *Drug Discovery Today*, Vol. 5, N° 5, 1 May 2000, pp 183-194(12).
 12. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* .1999, 285: 1-32.
 13. CYTED-Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1995. Manual de Técnicas de Investigación. p61-62 y p 214-225.
 14. Skehan. New Colorimetric cytotoxicity Assay for Anticancer- Drug Screening. *JNCI* 1990, 82(13): 1107-1112.
 15. Simmons G. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and Lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997, 276 (5310):276-9.
 16. Shao X. A non-radioactive microtitre plate reverse transcriptase (RT) assay based on immobilised template for screening of RT inhibitors and evaluation of their mode of action. *Antiv. Chem. Chemother.* 1997, 8: 149-159.
 17. Tan GT, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Evaluation of Natural products as inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). Reverse Transcriptase. *J Nat Prod* 1991, 54(1): 143-154.
 18. Kusumoto IT, Nakabayashi T. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. *Phytotherapy Reseach* 1995, 9: 180-184.
 19. Chung TH, Kim JC. Investigation of korean plant extracts for potencial phyto therapeutic agents against B-virus Hepatitis. *Phytotherapy Research* 1995, 9:429- 434.

— o —