

DESCUBRIMIENTO DE UNA FRACCIÓN DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS A  
PARTIR DE RAICES DE *Cecropia telenitida*, CON POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE  
LA ENZIMA 11 $\beta$ -HSD1.

Alejandro Blanco Castro

Universidad ICESI

Facultad de Ciencias Naturales

Programa de Química Farmacéutica

Santiago De Cali

2018

DESCUBRIMIENTO DE UNA FRACCIÓN DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS A  
PARTIR DE RAICES DE *Cecropia telenitida*, CON POTENCIAL INHIBITORIO  
SOBRE LA ENZIMA 11 $\beta$ -HSD1.

Alejandro Blanco Castro

Trabajo de grado para optar al título de pregrado en Química Farmacéutica

Tutor

Guillermo León Montoya, PhD

Universidad ICESI

Facultad de Ciencias Naturales,  
Programa de Química Farmacéutica

Santiago de Cali

2018



APROBADO POR:

---

Director del Proyecto: Guillermo León Montoya

---

Evaluador: Gustavo Adolfo Gutiérrez

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy mis más sinceros agradecimientos a las personas que participaron en esta etapa de mi vida

A mi papá, a mi mamá y mi hermano, les doy gracias por apoyarme en cada momento de mi vida y en mi desarrollo como persona y profesional. Sin ellos y sus consejos no hubiese tenido el coraje y la guía para seguir adelante.

A mis tutores Guillermo León Montoya y Aram Joel Panay, por permitirme ser parte de sus semilleros de investigación y enriquecerme de conocimiento y sabiduría. Especialmente quiero darles las gracias por su compromiso y guía durante este proyecto.

A Vanitty López, una compañera y amiga incondicional con la que desarrolle este proyecto. Especialmente darle las gracias por toda la colaboración que me diste en este proyecto y durante mi carrera.

A Gustavo Gutiérrez y Laura Valencia, que siempre estuvieron presentes durante todo el desarrollo de este proyecto aconsejándome y guiándome

## CONTENIDO

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCION .....	7
2.1. DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y DATOS ESTADÍSTICOS .....	8
2.2. BIOQUÍMICA DEL CORTISOL Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....	9
2.3. ENZIMA 11B-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA Y SU ROL EN LA REGULACIÓN DE CORTISOL .....	9
2.4. <i>CECROPIA TELENITIDA</i> Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS COMO INHIBIDORES SOBRE 11B-HSD1 .....	11
2.5. FLUORESCENCIA HOMOGÉNEA RESUELTA EN EL TIEMPO (HTRF) .....	15
3. METODOLOGÍA PROPUESTA .....	17
3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y SU PREPARACIÓN .....	17
3.2. EXTRACCIÓN EN PLANTA PILOTO.....	17
3.3. PREPARACION DE LA MUESTRA Y FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO EN EL EQUIPO ISOLERA FLASH ONE .....	18
3.4. DETERMINACION CUALITATIVA DE TRITERPENOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA (TLC) .....	20
3.5. ENSAYO ENZIMÁTICO CON 11B-HSD1 Y CUANTIFICACIÓN DE CORTISOL CON EL KIT CORTISOL HTRF® .....	20
3.6. ENSAYO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN CON 11B-HSD1 Y CUANTIFICACIÓN DE CORTISOL CON EL KIT CORTISOL HTRF®.....	22
4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. PREPARACION Y EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL.....	24
4.2. FRACCIONAMIENTO Y DETERMINACION CUALITATIVA DE TP POR MEDIO DE TLC .....	26
4.3. ENSAYO ENZIMATICO CON 11β-HSD1 Y LECTURA DE LAS MUESTRAS EN EL LECTOR DE PLATOS SYNERGY H1 .....	30
4.4. ENSAYO ENZIMATICO DE INHIBICIÓN CON 11β-HSD1 Y LECTURA DE LAS MUESTRAS EN EL LECTOR DE PLATOS SYNERGY H1.....	35
5.0 CONCLUSIONES .....	38
6.0 RECOMENDACIONES .....	39
7. REFERENCIAS .....	40

## 1. RESUMEN

La diabetes es un trastorno metabólico que se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre debido a una resistencia insulínica o ausencia total de la misma. Existen principalmente dos tipos de diabetes, la tipo 1 asociada a la ausencia total de insulina y la tipo 2 asociada a resistencia insulínica la cual representa más del 90% de los diagnósticos <sup>1</sup>. Diversos estudios demuestran que el cortisol juega un papel importante en la progresión y aparición de esta enfermedad por lo que se están buscando formas de controlar los niveles de cortisol en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, una de ellas es mediante la inhibición de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1), la cual cataliza la formación de cortisol a partir de cortisona, además se ha evidenciado que esta enzima es inhibida por una fracción de moléculas conocidas como triterpenos pentacíclicos, los cuales están presentes en las raíces de una planta llamada *Cecropia telenitida* <sup>2</sup>. Actualmente se están estudiando los productos naturales como fracciones de composición conocida y que tengan un efecto terapéutico reproducible, por lo que este proyecto tiene como objetivo identificar y purificar una fracción de triterpenos pentacíclicos provenientes de las raíces de *Cecropia telenitida* como hit inhibitorio de la enzima 11 $\beta$ -HSD1.

Partiendo del material vegetal y utilizando la planta piloto de extracción fueron obtenidos 20 g de extracto crudo de raíces. Por medio de procesos automatizados de purificación se realizó un aislamiento y fraccionamiento biodirigido conocido como "*bioguide isolation*" como estrategia de identificación de potenciales inhibidores. Fueron obtenidas 15 fracciones de triterpenos pentacíclicos las cuales fueron evaluadas en un ensayo enzimático de inhibición con 11 $\beta$ -HSD1. Las concentraciones de cortisol producidas en el ensayo fueron cuantificadas utilizando como método de detección un kit HTRF®

**Palabras claves:** Diabetes mellitus tipo 2, enzima 11 $\beta$ -HSD1, triterpenos pentacíclicos, *Cecropia telenitida*,

## 2. INTRODUCCION

Históricamente, los fármacos han sido descubiertos a través de la identificación de principios activos de medicinas tradicionales o un descubrimiento no planeado. Hoy en día el uso de metodologías de *"high throughput screening"* (HTS) se ha convertido en una práctica común en la que cientos de compuestos son ensayados para identificar cuales tienen el potencial de unirse a un blanco molecular específico y modular su actividad; posteriormente estos compuestos potenciales o *"hits"* son evaluados en células y después en animales para evaluar su eficacia.<sup>3</sup>

Los productos naturales han sido la fuente de cientos de principios activos de fármacos que hoy se usan diariamente. Más de 100 compuestos derivados de productos naturales se encuentran actualmente en ensayos clínicos y al menos 100 proyectos similares están en desarrollo preclínico<sup>4</sup>. Sin embargo, con los avances en las técnicas de fraccionamiento para aislar y purificar productos naturales y en técnicas instrumentales para determinar estructuras, se ha logrado acelerar el desarrollo de compuestos a partir de fracciones químicas de composición conocida, lo cual puede llegar a ser muy prometedor<sup>4</sup>. Lo anterior se debe a que por una parte es extremadamente lento y costoso crear extensas colecciones de moléculas aisladas y estructuralmente caracterizadas, y por otra parte hay evidencia que estos compuestos naturales actúan mejor en conjunto que de forma individual<sup>5</sup>, es decir hay un efecto de sinergia.

De acuerdo a la definición de Mosby, el sinergismo farmacológico es una acción conjunta de dos o más moléculas en la que una de ellas mejora la acción de la otra y se produce un efecto mayor<sup>6</sup>. Lo anterior se ha venido aplicado desde décadas atrás, un ejemplo de ello es la medicina tradicional china donde utilizaban mezclas de plantas para obtener beneficios en salud. Por otra parte, Chu Qin y colaboradores<sup>5</sup> realizaron un estudio donde se evaluaron la actividad sinérgica de productos naturales y llegaron a resultados de que el 24% y 34% de combinaciones presentan un sinergismo muy fuerte. Lo anterior indica la necesidad de estudiar los productos naturales como una fracción química de composición conocida que tenga un efecto terapéutico reproducible. La mayoría de estudios en productos naturales apuntan a terapias contra el cáncer y terapias antibióticas o antivirales, sin embargo, hay

muchas áreas terapéuticas que también requieren una atención, una de ellas es la diabetes mellitus tipo 2 donde cada vez los porcentajes de personas que la padecen en el mundo son mayores.

## **2.1. DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y DATOS ESTADÍSTICOS**

Según el informe de la OMS acerca de la diabetes, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014 en comparación a los 108 millones de 1980, esto indica un crecimiento exponencial de esta enfermedad <sup>7</sup>. La prevalencia mundial de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año. En 2012, la diabetes provocó 1,5 millones de muertes debido al incremento de otros factores de riesgo causados por la diabetes como lo son el sobrepeso y enfermedades cardiovasculares <sup>7</sup>. En la última década, la prevalencia de la diabetes ha aumentado más rápido en países de bajos y medianos ingresos en comparación con los de altos ingresos. La asociación colombiana de diabetes ha estimado que el 7% de la población colombiana mayor de 30 años tiene diabetes tipo 2<sup>8</sup>. La diabetes no solo trae complicaciones a nivel del organismo, también hay repercusiones económicas para las personas que la padecen y sus familias, así como para los sistemas de salud. Lo anterior indica la necesidad de crear terapias farmacológicas alternativas de costos más bajos que ayuden tanto a prevenir la enfermedad como a mejorar la calidad de vida del paciente.

La diabetes es un trastorno metabólico crónico que se caracteriza por una concentración de glucosa en sangre elevada. Dentro de la diabetes se encuentra la tipo 2 la cual se caracteriza por una resistencia a insulina, es decir que esta no es suficiente para ingresar toda la glucosa que está en sangre a los diferentes órganos y tejidos. La hiperglucemia se debe a una síntesis endógena e incontrolada de glucosa en el hígado y a una disminución de su captación debido a la resistencia insulínica, causando que bajas ingestas de carbohidratos generen niveles muy altos de glucosa en sangre. Cuando hay demasiada glucosa en sangre esta se deja de reabsorber a nivel renal y ocurre lo contrario, se empieza a eliminar por orina, provocando una diuresis osmótica, deshidratación, sed y aumento de la ingesta tanto de líquidos como de alimentos, a lo anterior se le conoce como las 3 polis, “poliuria, polidipsia y polifagia”. Como se mencionó anteriormente los trastornos metabólicos de la diabetes dan lugar a varias

complicaciones, como por ejemplo angiopatías, disfunciones del endotelio vascular, problemas cardiovasculares, neuropatías, insuficiencias renales crónicas y muchas otras.<sup>1</sup>.

## **2.2. BIOQUÍMICA DEL CORTISOL Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2**

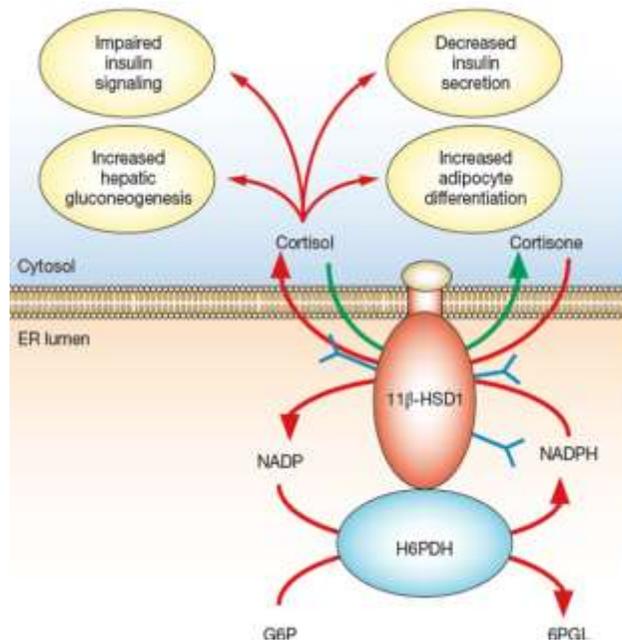
La hidrocortisona o cortisol es un glucocorticoide sintetizado por la corteza suprarrenal en respuesta a la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y es el glucocorticoide más representativo en el ser humano<sup>1</sup>. La producción de cortisol es elevada en periodos de estrés y depleción de la densidad ósea, contribuye a elevar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. El cortisol se une a dos receptores intracelulares, el receptor de mineralocorticoides y el receptor de glucocorticoide, ambos de tipo nuclear, adicionalmente se ha demostrado que el cortisol tiene una mayor afinidad por el receptor mineralocorticoide.

Los principales efectos del cortisol recaen sobre el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas. Los glucocorticoides pueden producir una disminución de la captación y utilización de la glucosa y aumento de la gluconeogénesis, causando hiperglucemia. Por otra parte, hay reducción en la síntesis de proteínas y aumento en su degradación lo que lleva a una atrofia muscular. Los glucocorticoides tienden a disminuir la absorción de calcio en el tubo digestivo y aumentar su excreción renal, llevando junto con el efecto de degradación de proteínas a una depleción de la densidad ósea y finalmente osteoporosis <sup>1</sup>. Por lo anterior puede evidenciarse que el cortisol juega muchos papeles a nivel fisiológico en particular el metabolismo de los carbohidratos relacionado con la diabetes y de ahí radica la importancia en que sus niveles sean controlados. Las enzimas de la familia 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa son reguladores claves en la concentración de cortisol intracelular

## **2.3. ENZIMA 11 $\beta$ -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA Y SU ROL EN LA REGULACIÓN DE CORTISOL**

Se han identificado dos isoformas de esta enzima. La enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2) cataliza la conversión de cortisol (activo) a cortisona (inactivo) principalmente en tejidos sensibles a mineralocorticoides como el riñón y el colon, protegiendo a los receptores de mineralocorticoides de una unión excesiva de cortisol;

estudios muestran que una deficiencia en esta enzima por factores genéticos puede contribuir a desarrollar hipertensión <sup>9</sup>. La enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1) es una reductasa dependiente del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) que cataliza la formación de cortisol a partir de cortisona (forma inactiva), es decir posee un efecto contrario al tipo 2 (ver **figura 1**). El NADPH es generado a partir del NADP<sup>+</sup> mediante la acción de la enzima hexosa-6-fosfato deshidrogenasa. 11 $\beta$ -HSD1 se encuentra altamente expresada en el hígado y tejido adiposo, con su dominio catalítico ubicado hacia el lumen regenerando cortisol hacia el citosol. <sup>10</sup>.



**Figura 1.** Regulación de cortisol por 11 $\beta$ -HSD1<sup>10</sup>. G6P significa glucosa 6 fosfato y H6PDH es la enzima hexosa-6-fosfato deshidrogenasa

Aunque las concentraciones de cortisol no son elevadas en la diabetes mellitus tipo 2 y otras patologías como el síndrome metabólico y la obesidad, diversos estudios muestran que disminuir la concentración de cortisol a través de la inhibición selectiva de 11 $\beta$ -HSD1 representa una estrategia o mecanismo para mejorar la sensibilidad a insulina y prevenir la diabetes tipo 2. Estudios en roedores muestran que la inhibición de 11 $\beta$ -HSD1 mejora impresionantemente la sensibilidad a insulina al aumentar su secreción y también se ha

evidenciado una disminución en la gluconeogénesis hepática y disminución en la diferenciación de adipocitos, por lo cual es claro que esta enzima juega un papel importante en el tejido adiposo y en el desarrollo de obesidad.<sup>10</sup>

Estudios clínicos en humanos utilizando carbenoxolona, un antiinflamatorio inhibidor no selectivo de  $11\beta$ -HSD, mostró ser efectivo disminuyendo las tasas de producción de cortisol total, mejorando la sensibilidad a la insulina en todo el organismo y disminuyendo la tasa de producción de glucosa en pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo, la carbenoxolona es un agente que induce el aumento de mineralocorticoides con elevación de la presión arterial por la inhibición de la enzima tipo 2, por lo cual los inhibidores no selectivos no son una estrategia viable y es necesario buscar selectivos para evitar este tipo de efectos secundarios<sup>10</sup>.

Actualmente se están buscando inhibidores selectivos de  $11\beta$ -HSD1 pues, en primera medida los inhibidores no selectivos llevan consigo muchos problemas y en segunda medida la terapia actual de diabetes tipo 2 con antidiabéticos orales si bien es efectiva y prometedora, puede llegar a presentar algunos problemas. Uno de los problemas es el costo elevado; aunque las biguanidas son el tratamiento de primera línea y es un medicamento relativamente barato, muchas veces el paciente no lo puede consumir ya sea por patologías base que pueda tener o por efectos adversos que se pueda producir y lo remiten a medicamentos de mayor costo como lo son las terapias basadas en incretinas o inhibidores del cotransportador de glucosa acoplada al canal de sodio tipo 2<sup>11</sup>. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que el uso de estas terapias es exclusiva para cuando el paciente padece la enfermedad y no como forma preventiva o profiláctica. Debido a todo lo anterior, es de vital importancia estudiar los inhibidores selectivos de  $11\beta$ -HSD1.

#### **2.4. *Cecropia telenitida* Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS COMO INHIBIDORES SOBRE $11\beta$ -HSD1**

Hasta el 2005 solo dos inhibidores selectivos de  $11\beta$ -HSD1 habían sido descritos en detalle en la literatura. En el 2010 se aprobó una patente basada en derivados de perhidroquinolina y perhidroisoquilolona como inhibidores selectivos de dicha enzima<sup>12</sup>. Compuestos naturales

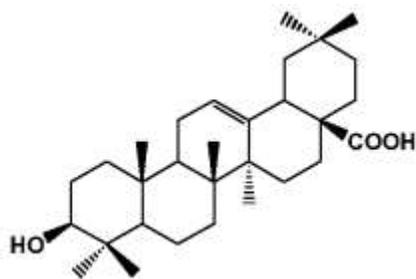
como bioflavonoides y triterpenos han sido identificados como inhibidores selectivos de 11 $\beta$ -HSD1 prometedores, como hipoglucemiantes y mediadores de factores inflamatorios<sup>13</sup>

Plantas del género *Cecropia* especialmente de la especie *telenitida* han demostrado tener propiedades hipoglucemiantes y antiinflamatorias<sup>13</sup>. El género *Cecropia* comprende unas 65 especies de árboles pertenecientes a la familia Urticaceae, donde se conocen vulgarmente como yarumo blanco o plateado, estos árboles pueden llegar a superar los 20 m de altura y 30 cm de diámetro (**ver figura 2**). Se localizan entre las secciones central y norte de la cordillera de los andes y se pueden encontrar en diferentes municipios de Antioquia como el Abejorral, Cocorná, La Ceja, La Unión y Rionegro. Su hábitat suelen ser los bosques húmedos y fríos con alturas de 1300m a 2600m. <sup>14</sup>

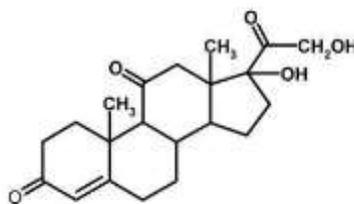


**Figura 2.** *Cecropia telenitida*

Actualmente, los estudios se han centrado sobre la especie *telenitida*, pues se ha demostrado que los metabolitos secundarios en las raíces de esta planta son los encargados de las diferentes acciones farmacológicas. Las fracciones o moléculas que se han encontrado en las raíces de esta planta son triterpenos pentacíclicos (nombrados de ahora en adelante como TP), a los cuales se les atribuye la actividad farmacológica o biológica, posiblemente debido a su semejanza estructural con la cortisona, sustrato endógeno de la enzima 11 $\beta$ -HSD1, ver (**figura 3 y 4**).



**Figura 3.** Esqueleto base de un TP



**Figura 4.** Estructura cortisona

Si bien los triterpenos tetra cíclicos presentan una homología estructural mayor con la cortisona, se ha demostrado que estos poseen una baja selectividad por la enzima, a diferencia de los pentaciclicos donde su selectividad es mayor. En un estudio realizado por Mosquera y colaboradores<sup>2</sup> fue construida una biblioteca química a partir de fracciones químicas derivadas de raíces de *Cecropia telenitida*, donde se aislaron y purificaron tres subfracciones, las cuales presentaron inhibición sobre la enzima 11 $\beta$ -HSD1. De estas 3 subfracciones la que mejor inhibición presentó fue la obtenida a partir de la extracción con diclorometano/acetato de etilo de ahora en adelante nombrada como CD16. Adicionalmente, cabe resaltar que de la fracción CD16 se aisló y purificó un TP con gran semejanza estructural al ácido yarúmico (otro TP caracterizado y reportado previamente a partir de raíces de la misma planta) y que inhibió a 11 $\beta$ -HSD1 en un 82% con un IC<sub>50</sub> de 0,95 $\mu$ M aproximadamente.

Este hecho demuestra que los TP provenientes de esta planta tienen un excelente potencial como inhibidores de la enzima, pues como se ha discutido anteriormente estos compuestos normalmente actúan de manera sinérgica y el hecho de que una fracción química como CD16 logre un porcentaje de inhibición tan alto claramente pone en evidencia que estos TP pueden llegar a ser candidatos ideales como terapia alternativa contra la diabetes mellitus tipo 2.

Por otro lado, Montoya y colaboradores<sup>13</sup> en un estudio realizado en roedores, identificaron un TP proveniente de las raíces de *Cecropia telenitida*, denominado ácido serjánico. En este estudio evaluaron el potencial del ácido serjánico como hipoglucemiante utilizando un modelo de roedor con resistencia insulínica<sup>13</sup>. Se demostró que el ácido serjánico mejoró la tolerancia a glucosa, incrementó los niveles de insulina y disminuyó la hiperglucemia en los roedores, este hecho demuestra en primera medida que el ácido serjánico tiene propiedades

hipoglucemiantes y en segunda medida que proporciona efectos beneficiosos sobre roedores y que se podría extrapolar a humanos para el diseño de terapias que controlen la glucosa en sangre. También se evidenció que estos TP reducían la expresión de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 en tejido adiposo de roedores, lo cual involucra los TP en la regulación de procesos inflamatorios.

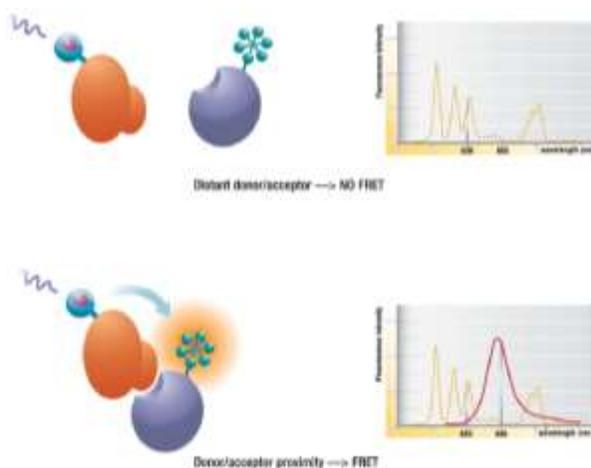
Con respecto a las propiedades antiinflamatorias anteriormente mencionadas, en otro estudio realizado por Montoya y colaboradores <sup>15</sup> se estudió una fracción de TP de raíces de *Cecropia*, donde fueron identificadas moléculas como el ácido serjánico, ácido goreishico 1, ácido 20-hidroxiursólico, ácido espergulagénico A junto con el reporte de una nueva molécula denominada ácido yarúmico<sup>15</sup>. Basados en un ensayo en células dendríticas demostraron que dosis no tóxicas de esos TP inhibían la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-12P70 y TNF- $\alpha$ , donde los compuestos más potentes y abundantes de la fracción fueron el ácido serjánico y ácido A espergulagénico. Diversos estudios demuestran que la obesidad se caracteriza por una elevada liberación de factores pro-inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), MCP-1, interleuquinas IL-6 a IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e incluso pacientes obesos con diabetes mellitus tipo 2 exhiben altos niveles de citoquinas proinflamatorias con una sensibilidad baja a insulina. <sup>16</sup> Lo anterior muestra que los TP pueden presentarse como una aproximación multifactorial a la diabetes, controlando no solo cortisol, sino también respuesta inflamatoria.

Ahora bien, retomando lo que se mencionaba al inicio del texto acerca de las metodologías HTS y como estas han contribuido al descubrimiento de "*hits*" (compuestos candidatos que logren modular un blanco molecular específico) a partir de un único ensayo totalmente automatizado; es pertinente resaltar el gran impacto que estas han tenido en el desarrollo de productos naturales a base de fracciones químicas de composición conocida, pues en un único ensayo permite analizar todas las fracciones que se obtienen de un proceso de purificación.

Entrando en detalle, la mayoría de ensayos HTS se basan en la emisión de luz ya sea por fluorescencia o luminiscencia. La fluorescencia puede ser brillante y ocurrir en una escala de tiempo muy pequeña (nanosegundos), por lo que se han diseñado diferentes métodos de detección para solucionar esos problemas. Uno de los métodos de detección que se ha venido utilizando frecuentemente es el de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF).

## 2.5 FLUORESCENCIA HOMOGÉNEA RESUELTA EN EL TIEMPO (HTRF)

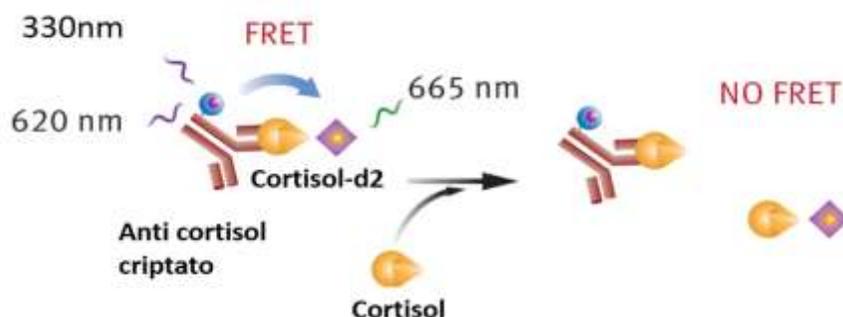
La fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) combina dos tecnologías, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y el tiempo resuelto (TR). En los ensayos HTRF se genera una señal a través de la transferencia de energía de resonancia fluorescente entre dos moléculas, un donador y un aceptor que normalmente son fluoróforos, esta emisión ocurre cuando estas dos moléculas están próximas entre sí. El donador tiene una fluorescencia de larga duración y el aceptor de corta duración, normalmente se utiliza el europio como donador de energía. Mediante esta técnica se logra detectar las interacciones moleculares entre biomoléculas y cuantificar analitos de interés <sup>17</sup>, en la **figura 5** se resume el principio de esta técnica.



**Figura 5.** Principio detrás de la tecnología HTRF<sup>17</sup>

Ahora bien, un ejemplo de la tecnología anteriormente explicada es el de un kit patentado por la marca Cisbio para cuantificar cortisol. El principio de este kit se basa en la tecnología HTRF, y es un inmunoensayo competitivo entre cortisol y cortisol-d2 (marcado), los cuales compiten por unirse a un anticuerpo monoclonal de anti cortisol marcado con europio-criptato<sup>17</sup>. Básicamente en este ensayo el cortisol-d2 es el aceptor y el anti cortisol criptato el donador que al encontrarse próximos generan una señal a través de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre las dos moléculas, esa señal es inversamente

proporcional a la concentración de cortisol en la muestra. En la **figura 6** se resume el principio de este inmunoensayo.



**Figura 6.** Principio del inmunoensayo competitivo entre cortisol y cortisol-d2, por unirse al anticortisol criptato<sup>17</sup>

Como se ha discutido a lo largo del texto, *Cecropia telenitida* posee muchas actividades biológicas que podrían llegar a mejorar la calidad de vida de personas con enfermedades como el síndrome metabólico, obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, y es necesario estudiar más a fondo esta planta en busca de nuevas terapias farmacológicas para las enfermedades anteriormente descritas.

Es pertinente resaltar que Colombia es un país con una gran biodiversidad, la cual debe ser aprovechada de la forma más adecuada en búsqueda de nuevos compuestos con interés terapéutico. *Cecropia telenitida* es una planta de distribución restringida en la región Andina por lo que se tiene una gran ventaja, además el uso del género *Cecropia* está aprobado según el listado de plantas medicinales aprobado por el Invima lo cual hace más fácil en términos legales su uso y aplicación.<sup>18</sup> Por todo lo anterior, es necesario enfocar los estudios de productos naturales a fracciones químicas de composición conocida que puedan producir un efecto terapéutico reproducible es por esta razón que se justifica la realización de este proyecto, el cual tiene como objetivo identificar y purificar una fracción de triterpenos pentacíclicos provenientes de las raíces de *Cecropia telenitida* como un hit inhibitorio de la enzima 11 $\beta$ -HSD1.

### **3. METODOLOGÍA PROPUESTA**

La metodología usada en este proyecto se basará en el trabajo de tesis "*Biblioteca química de moléculas derivadas de raíces de Cecropia telenitida y su evaluación como fuente de moléculas inhibitoras de la enzima 11 $\beta$ -HSD1*" realizado por Mosquera <sup>2</sup>

#### **3.1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y SU PREPARACIÓN**

Las raíces de *Cecropia telenitida* se recolectaron en el municipio La Ceja ubicado en el departamento de Antioquia, Colombia. Se recolectaron aproximadamente 10 kg de raíces secundarias, sin ocasionar daños graves a los especímenes muestreados. El material vegetal será identificado por Camilo Sánchez, botánico del herbario de la universidad Icesi, confirmando que el material colectado corresponda a *C. telenitida*.

La cantidad a coleccionar debe ser suficiente pues durante el proceso de reducción de tamaño de partícula y extracción, se puede perder una cantidad considerable de muestra. Para la recolección del material vegetal se contó con el permiso individual de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial a la corporación autónoma regional de las cuencas de los Rio Negro y Nare (CORNARE) otorgado al Dr. Guillermo León Montoya.

Una vez recolectadas las raíces estas se lavaron y se llevaron a un horno de circulación de aire seco a una temperatura de 45°C durante un periodo de 24 horas para evaporar el agua en los órganos vegetales y obtener las raíces totalmente secas. Con el material seco se llevó a cabo un proceso de reducción de tamaño de partícula con una lijadora de disco 60, donde se obtuvieron aproximadamente 1,0 kg de material vegetal pulverizado.

#### **3.2. EXTRACCIÓN EN PLANTA PILOTO**

Para la extracción se tuvo en cuenta la siguiente relación másica solvente-material vegetal, por cada gramo de bio masa se utilizaron 5ml de solvente, por lo que para 1000g de material

vegetal se utilizaron 5L de solvente. Se depositaron 1000g de material vegetal en un Erlenmeyer con capacidad de 5L y se adicionaron 5L de diclorometano/acetato de etilo en proporción 1:1. El material vegetal con el solvente se depositó en la planta piloto de extracción y se dejó en constante agitación durante un día. Terminado ese tiempo, el extracto se concentró en un rotaevaporador marca Heidolph, para finalmente colocarlo en un frasco Schott y pesarlo.

### **3.3. PREPARACION DE LA MUESTRA Y FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO VÍA CROMATOGRAFÍA FLASH**

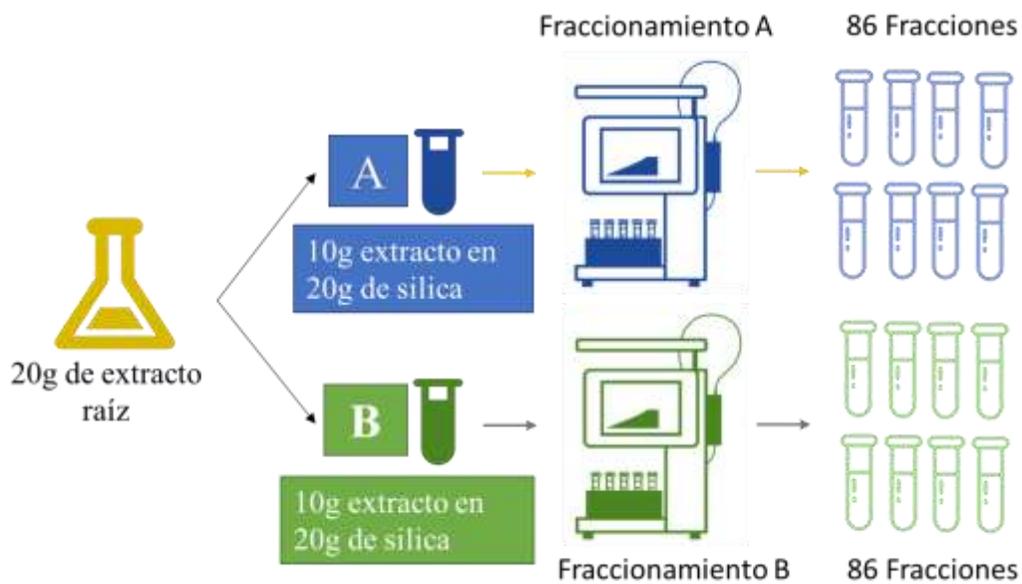
Se obtuvo aproximadamente 20 g de extracto crudo, los cuales se dividieron en dos cantidades iguales de 10g. El extracto se filtró al vacío con el fin de evitar sólidos y se realizó el siguiente tratamiento antes de inyectar la muestra, por cada 10g de extracto crudo se utilizaron 20 g de silica KP con tamaño de partícula de 60-200  $\mu\text{m}$  para que la muestra se adsorbiera en la superficie de la silica. El extracto se solubilizo y se concentró.

Una vez preparada la muestra, esta se adicionó en un cartucho el cual se adaptó a una columna SNAP® previamente empacada con 340g de silica KP. El fraccionamiento se llevó acabo en el equipo Isolera Flash One (Biotage,USA) y siguiendo el protocolo establecido por Mosquera<sup>2</sup>. La corrida se realizó utilizando como fase móvil diclorometano, acetato de etilo y metanol, las condiciones cromatográficas se recopilan en la **tabla 1**. Se realizó un gradiente de 10 volúmenes de columna (VC) que comenzó con 100% de diclorometano, hasta llegar a 100% de acetato de etilo. Para terminar el fraccionamiento y con el fin de hacer eluir todos los compuestos que pudieron quedar retenidos en la columna se adicionaron 3 VC de metanol. El equipo recolecto y detecto de forma automática 100 mL de cada fracción mediante un sistema de detección UV acoplado al equipo que mide a 200 y 240 nm, en total se obtuvieron 86 fracciones. Con los otros 10g de extracto crudo se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente y de igual forma se obtuvieron otras 86 fracciones. A partir de este momento al primer fraccionamiento correspondiente a los primeros 10g de extracto crudo se le denominara A y al segundo fraccionamiento B, adicionalmente cabe resaltar que ambos vienen de la misma matriz, las letras únicamente hacen referencia a que se realizaron dos fraccionamientos por separado, por lo que las fracciones obtenidas tendrán

la letra A o B dependiendo de la corrida a la cual correspondan. En la **figura 7** se muestra un esquema que resume lo descrito anteriormente

PARAMETRO	VALOR
<b>Volumen de cada fracción</b>	100ml
<b>Flujo</b>	200ml/min
<b>Presión</b>	7psi
<b>Cartucho</b>	SNAP KP-Sil 340g
<b>Fase móvil</b>	Diclorometano/acetato etilo/metanol
<b>Detector UV1</b>	200nm
<b>Detector UV2</b>	240nm

**Tabla1.** Condiciones cromatográficas de la Isolera Flash One para el fraccionamiento A y B



**Figura 7.** Esquema de general del fraccionamiento del extracto de raíz

### **3.4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE TRITERPENOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN PLACA FINA (TLC)**

Con el fin de determinar de forma cualitativa la presencia de TP en las fracciones se realizó cromatografía en placa fina (TLC), la cual consiste de placas silica-gel en un soporte de aluminio. Debido al número elevado de fracciones se decidió sembrar únicamente los múltiplos de tres, es decir las fracciones 3, 6, 9 etc. Para ello se tomaron 10µl de cada fracción y se sembraron con un capilar en placas de aluminio de 10x10 cm soportadas en silica-Gel que posteriormente se introdujeron en una cámara cromatográfica previamente acondicionada con fase móvil diclorometano/acetato de etilo en proporción 1:1. Al finalizar la corrida se realizó el proceso de derivatización utilizando vainillina en etanol al 1% y ácido sulfúrico en etanol al 5%. Todas las placas de TLC obtenidas en este trabajo se realizaron usando el procedimiento anteriormente descrito.

Una vez comprobada la presencia de TP en las fracciones, se volvió a realizar las TLC pero esta vez comparando las fracciones obtenidas frente a CD16 o fracción líder ya que hay información suficiente de que esta fracción es capaz de modular la actividad de 11β-HSD1 de forma significativa. En base a lo anterior, las fracciones con mayor similitud en cuanto a perfil cromatográfico respecto a CD16 fueron concentradas y sembradas en TLC para compararlas frente a CD16. Finalmente, las fracciones con  $R_f$  similar a CD16 fueron concentradas a sequedad en el rota evaporador y posteriormente el sólido obtenido se transfirió a crioviales de 1,5ml los cuales fueron pesados y rotulados, con esas fracciones se llevó a cabo el ensayo enzimático con 11β-HSD1.

### **3.5. ENSAYO ENZIMÁTICO CON 11B-HSD1 Y CUANTIFICACIÓN DE CORTISOL CON EL KIT CORTISOL HTRF®**

Antes de realizar el ensayo enzimático de inhibición, se realizó un test del ensayo enzimático (sin fracciones) con el fin de verificar la funcionalidad de los microsomas hepáticos, determinar el tiempo de incubación y la cantidad de microsomas hepáticos para una óptima producción de cortisol. Si bien ya todo lo anterior había sido realizado y estandarizado por Mosquera <sup>2</sup>, la autora recomienda que al trabajar con microsomas provenientes de un nuevo lote se debe verificar su funcionalidad a través del tiempo y que las producciones de cortisol

son óptimas antes de realizar el ensayo de inhibición. Adicional a lo anterior, también se evaluó un sistema de regeneración de NADPH ya que como se mencionó anteriormente la enzima 11 $\beta$ -HSD1 es dependiente de este cofactor, que se puede añadir en exceso o acoplar un sistema de regeneración del mismo. Este sistema de regeneración consiste de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, su sustrato glucosa 6 fosfato y NADP<sup>+</sup> (ver **figura 1**). Los ensayos que contenían el sistema de regeneración antes descrito se les llamara "acoplados" y los que no lo tengan "no acoplados" (se añade en exceso NADPH), a continuación, en la **tabla 2** se muestran todas las variaciones realizadas en el ensayo enzimático.

<b>Ensayo enzimático</b>		
<b>Cofactor NADPH</b>	<b>Volumen de microsomas utilizado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Tiempo de incubación (h)</b>
ACOPLADO	1	3
		6
	2	3
		6
	4	3
		6
NO ACOPLADO	1	3
		6
	2	3
		6
	4	3
		6

**Tabla 2.** Variaciones realizadas en el ensayo enzimático

La enzima 11 $\beta$ -HSD1 se encuentra en microsomas de hígado humano, los cuales se incubaron a 3 y 6 horas (variando la cantidad descrita en la tabla 2) a 37°C en un medio que contenía buffer Tris-Hcl 20mM, NADPH 250 $\mu$ M y cortisona 200nM, lo anterior para la reacción enzimática "no acoplado". Para la reacción enzimática "acoplado" con el sistema de regeneración se utilizó lo mismo descrito anteriormente y adicionalmente glucosa 6

fosfato 2 mM, NADP<sup>+</sup> 0,67mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. También se realizaron los siguientes controles que se muestran a continuación en la **Tabla 3**

<b>CONTROL I</b>	Reacción sin NADPH y sin cortisona. La cortisona se sustituye por cortisol
<b>CONTROL II</b>	Reacción con cortisona y sin NADPH
<b>CONTROL III</b>	Reacción con NADPH únicamente.
<b>CONTROL NEGATIVO</b>	Únicamente Buffer Tris-Hcl
<b>CONTROL POSITIVO</b>	Únicamente estándar cortisol

**Tabla 3.** Controles realizados para el ensayo enzimático

Finalmente se realizó una curva de calibración de 6 puntos con estándar de cortisol y buffer Tris-Hcl. Terminado el tiempo de incubación se procedió a determinar la producción de cortisol con un kit de HTRF® de la marca Cisbio, para ello a cada reacción enzimática se le adiciono los reactivos cortisol-d2 y anticortisol criptato. Las medidas se tomaron en un lector de platos Synergy H1 durante 2 horas a dos longitudes de onda: 665nm la cual corresponde a la señal emitida cuando el cortisol-d2 y anticortisol criptato están unidos, y 620nm cuya señal es producida por el anticortisol criptato cuando es excitado. Es pertinente resaltar que todas las reacciones enzimáticas se realizaron por triplicado, mientras que la curva de calibración se realizó por duplicado.

### **3.6. ENSAYO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN CON 11B-HSD1 Y CUANTIFICACIÓN DE CORTISOL CON EL KIT CORTISOL HTRF®**

Para el ensayo enzimático de inhibición se escogieron un total de 15 fracciones, 9 del fraccionamiento A y 6 del fraccionamiento B y se pesó 1mg de cada fracción .

Se preparó una solución madre por cada fracción a evaluar con una concentración de 1000 ppm en dimetilsulfoxido (DMSO).

Para realizar el ensayo de inhibición se decidió utilizar el sistema de regeneración del cofactor NADPH, 3µl de microsomas hepáticos y una incubación de 3h; adicionalmente se adicionaron 2µL de las soluciones de trabajo previamente preparadas y se obtuvieron un total de 15 reacciones enzimáticas correspondientes a las 15 fracciones previamente

seleccionadas. También se realizaron los siguientes controles que se muestran a continuación en la **Tabla 4**.

<b>CONTROL CARBENOXOLONA</b>	Reacción enzimática con carbenoxolona
<b>CONTROL NADPH/NADP+</b>	Reacción enzimática sin NADPH y sin NADP+
<b>CONTROL DMSO</b>	Reacción enzimática únicamente con DMSO al 1%
<b>CONTROL POSITIVO</b>	Únicamente estándar cortisol
<b>CONTROL NEGATIVO</b>	Únicamente Buffer Tris-Hcl

**Tabla 4.** Controles realizados para el ensayo enzimático de inhibición

La metodología en cuanto a preparación de las reacciones enzimáticas y cuantificación de cortisol se realizó de la misma forma descrita en la sección 3.5.

## **4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

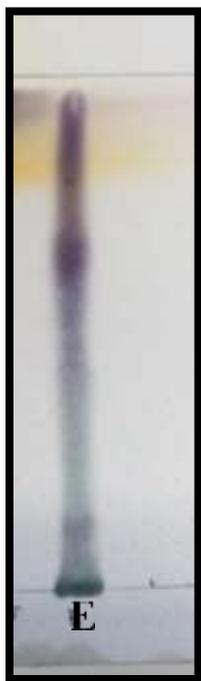
En general la estrategia de este proyecto consistió en obtener un extracto crudo de raíces de *Cecropia telenitida* utilizando como solvente diclorometano/acetato de etilo y fraccionarlo utilizando como técnica la cromatografía flash preparativa en el equipo Isolera Flash One. Se prefiere esta técnica pues permite una mayor inyección de muestra, no requiere preparación previa de la misma, es robusta, automatizada y reproducible. Posteriormente, se realizó un análisis de forma cualitativa de los perfiles químicos presentes en las fracciones utilizando TLC que, aunque es una técnica de baja sensibilidad permite dar una mirada a primera vista de las diferentes moléculas que se pueden encontrar en una fracción, además es una técnica de bajo costo y sencilla de llevar a cabo. Finalmente se eligieron algunas fracciones para llevar a cabo el ensayo enzimático de inhibición con 11 $\beta$ -HSD1

### **4.1. PREPARACION Y EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL**

Teniendo en cuenta que se partió de 10kg de raíces y que después del proceso de reducción de tamaño de partícula con la lijadora de disco 60 se obtuvo 1,0kg de material evidenciando que en este proceso se pierde una gran cantidad de muestra y no es del todo eficiente. Sin embargo se observó una gran reducción del tamaño de partícula que finalmente permite aumentar área superficial de contacto que favorecerá el proceso de extracción.

La extracción líquido-sólido es una técnica de separación que básicamente busca extraer las moléculas de una matriz sólida utilizando un disolvente orgánico a fin a los compuestos a extraer. Debido a los estudios realizados por Mosquera<sup>2</sup> ya había información previa acerca de los metabolitos secundarios encontrados en *C.telenitida* y su solubilidad, por lo que se decidió utilizar como disolvente diclorometano/acetato de etilo.. Si bien la naturaleza de los TP es apolar debido a su esqueleto carbonado, también se debe tener en cuenta los diferentes sustituyentes que puede llegar a tener este tipo de moléculas como lo son ácidos carboxílicos, cetonas, metoxilos e hidroxilos que le otorgan cierto grado de polaridad, por ende, el disolvente diclorometano/acetato de etilo al tener una mediana polaridad es ideal para extraer el mayor número de moléculas tipo TP.

Luego de realizar el proceso de extracción en la planta piloto se obtuvo un extracto crudo de 20g, lo cual también demuestra que la extracción es un proceso en el que se pierde una cantidad significativa de muestra. Antes de realizar el fraccionamiento se decidió llevar a cabo una evaluación del perfil químico del extracto de raíces obtenido empleando TLC con el fin de comprobar la presencia de TP. A continuación en la **figura 8** se muestra el perfil cromatográfico del extracto crudo de raíces de *C.telenitida*

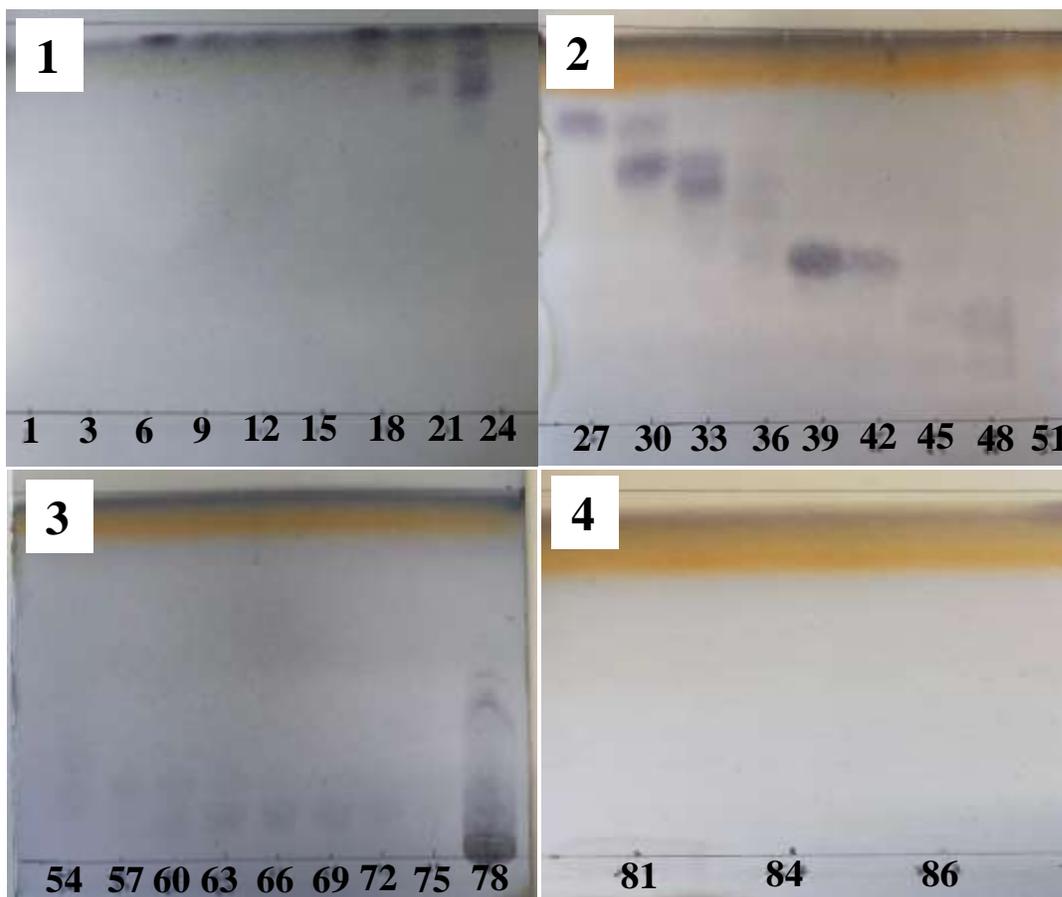


**Figura 8.** TLC de extracto raíces *C. telenitida*, donde la E representa la palabra extracto

De acuerdo al libro "*plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas*"<sup>19</sup> al realizar el proceso de derivatización con los reveladores vainillina y ácido sulfúrico en etanol se obtienen bandas moradas y azules características de triterpenos. Como se observa en la **figura 8** el proceso de extracción con diclorometano/acetato de etilo fue exitoso y hay una gran cantidad de moléculas de tipo TP de diferentes polaridades que se evidencian en toda la placa. Comprobada la presencia de TP se realizó el fraccionamiento.

## 4.2. FRACCIONAMIENTO Y DETERMINACION CUALITATIVA DE TP POR MEDIO DE TLC

Como se mencionó anteriormente el fraccionamiento se llevó a cabo mediante cromatografía preparativa que permite inyectar mayores cantidades de muestra. A diferencia de otras técnicas de cromatografía como HPLC donde se mide el tiempo de retención, el sistema cromatográfico mide en volúmenes de columna, es decir lo mililitros que gasta de fase móvil en atravesar la columna para hacer eluir un compuesto. Al realizar un gradiente que iniciaba con 100% diclorometano y finalizaba con 100% de acetato de etilo, se buscaba eluir todas las moléculas presentes en el extracto y así obtener una mayor variedad de moléculas con diferentes polaridades. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que las primeras fracciones en eluir de la columna son de naturaleza apolar, y las últimas fracciones en eluir son las más polares pues interactúan mejor con la sílica. Con las 86 fracciones obtenidas del fraccionamiento A, se realizaron 4 placas de TLC donde únicamente se sembraron múltiplos de 3. La **figura 9** muestra los resultados del análisis cromatográfico.



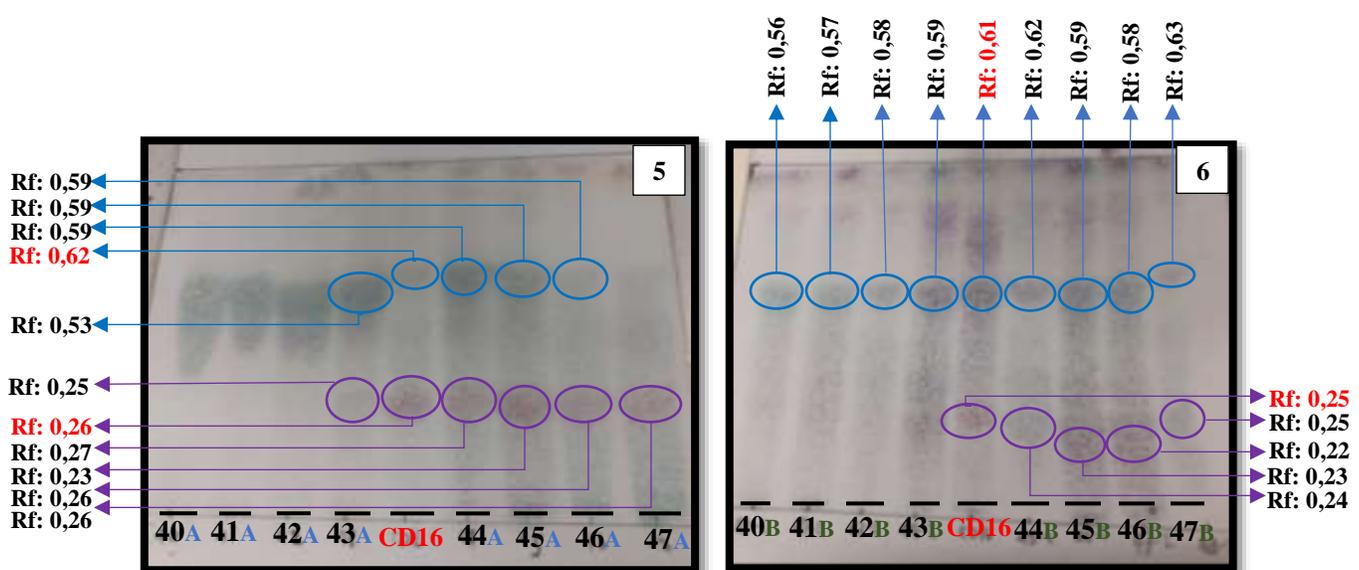
**Figura9.** TLC correspondiente a las fracciones A. El número en el cuadro blanco corresponde al número de placa y el número en la parte inferior corresponde a la fracción.

De forma general se puede observar que el proceso de purificación fue exitoso, pues se observan bandas definidas, a diferencia de la **figura 8** en la que claramente no hay bandas pues no se había realizado ningún proceso de fraccionamiento. También se puede observar bandas moradas con lo que permite de manera preliminar, asumir la presencia de TP en las fracciones. Por otra parte, se evidencia que en la placa numero 1 hay ausencia de bandas hasta la fracción 21, en concordancia con lo mencionado anteriormente donde las primeras moléculas en eluir de columna son de naturaleza apolar, por lo que prácticamente no serán retenidas. En cuanto a la placa número 2 ya se empiezan a observar bandas definidas, cada vez alejándose más del frente del solvente pues empiezan a ser moléculas medianamente polares por lo que interactúan mejor con la sílica y pueden ser retenidas. En la placa número 3 no se observan muy bien las bandas, posiblemente a la baja concentración de moléculas que hay en esas fracciones. Adicionalmente se observa que la banda de la fracción 78 quedo prácticamente en la zona de aplicación de la muestra, eso se debe a que esta fracción fue la que eluyó con el lavado de metanol, es decir donde se encuentran las moléculas más polares por lo que serán muy afines a sílica. Finalmente, en la placa número 4 no se observa ninguna banda debido a lo descrito anteriormente.

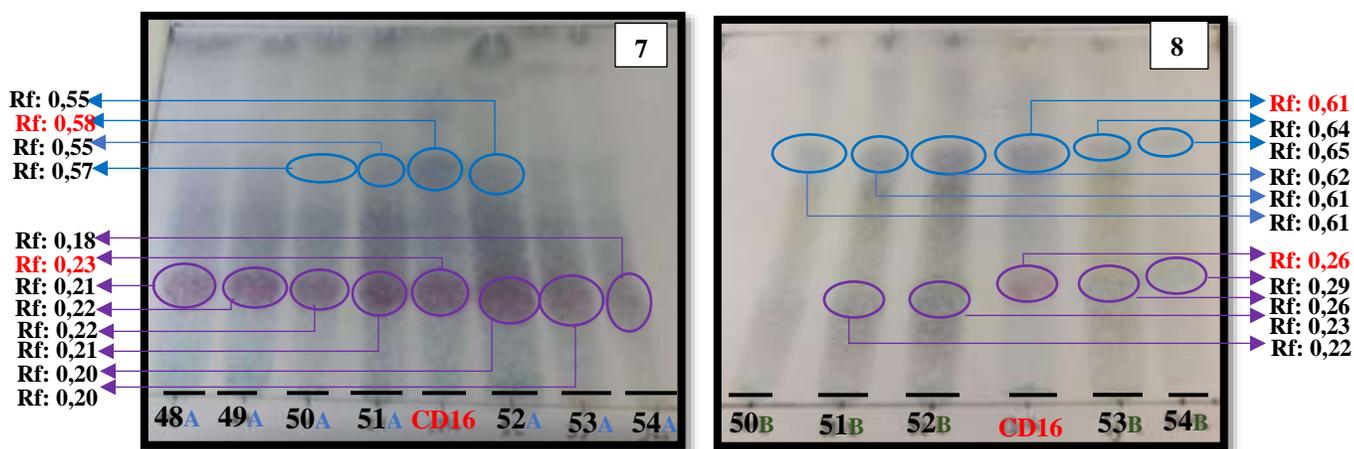
Una vez comprobada la presencia de TP de forma cualitativa en las fracciones, se decidió buscar aquellas que presentaran un perfil cromatográfico similar a CD16, pues como se mencionó anteriormente esta es la fracción hit que inhibe en mayor porcentaje a 11 $\beta$ -HSD1. Al ser muchas fracciones (86 por cada fraccionamiento) se realizó una búsqueda dirigida de CD16, es decir que se tomaron directamente las fracciones que pudieran tener el perfil cromatográfico más similar; para ello se tenía información previa de que las fracciones con mayor probabilidad de tener el perfil similar a CD16 se encontraba entre las fracciones 40 a 54, ya que es el mismo protocolo de fraccionamiento descrito por Mosquera, donde fue purificada CD16.

Sin embargo, como se observa en la **figura 9** en la placa número 2 y 3 las bandas de las fracciones 40 a 54 A salieron muy tenues posiblemente a la baja concentración de moléculas presentes en estas fracciones, por lo que se decidió concentrarlas de forma individual en el

rotaevaporador para observar mejor sus perfiles cromatográficos y poderlas comparar frente a CD16 de forma individual. El mismo procedimiento descrito anteriormente se realizó para las fracciones 40 a 54 obtenidas del fraccionamiento B. A continuación, en las **figuras 10 y 11** se muestra las TLC obtenidas de las fracciones 40 a 54 tanto de A como de B, cada placa con su carril comparativo de CD16. Adicionalmente, se compararon los perfiles cromatográficos de las fracciones A con las de B, esto con el fin de observar la reproducibilidad de la técnica, ya que al provenir de la misma matriz y al ser fraccionadas con las mismas condiciones, las fracciones deberían ser prácticamente iguales o presentar perfiles cromatográficos similares.



**Figura 10.** TLC con Rf incluido de fracciones 40 a 47. A la izquierda se encuentran las fracciones A y a la derecha las fracciones B. Rf significa retention factor.



**Figura 11.** TLC con Rf incluido de fracciones 48 a 54. A la izquierda se encuentran las fracciones A y a la derecha las fracciones B. Rf significa retention factor.

En la **Figura 10 y 11** los círculos morados y azules corresponden con los colores de las bandas, las cuales son características de TP. Adicionalmente se calculó el Rf de cada fracción con el fin de poder comparar sus perfiles cromatográficos frente a CD16.

A diferencia de otras cromatografías líquidas como HPLC donde se mide el tiempo de retención, en TLC se convierten en una distancia de migración en la placa (Rf) y que expresa la retención relativa de un analito. Los compuestos ascienden por la sílica a diferentes velocidades y de acuerdo a su polaridad y afinidad por la ella tendrán diferentes valores de Rf. El Rf es de gran importancia pues es característico de cada compuesto en un desarrollo cromatográfico controlado y exhibe un perfil cromatográfico específico para cada compuesto.

Ahora bien, teniendo en cuenta lo anterior se observa en las **Figuras 10 y 11** que los perfiles cromatográficos de las fracciones A y B son muy similares ya que vienen de la misma matriz y fueron fraccionadas bajo las mismas condiciones. Esto evidencia que la cromatografía flash es una técnica reproducible ya que se hicieron dos fraccionamientos iguales con el mismo material y se llegaron a resultados similares. Por otra parte, se observa que el perfil cromatográfico de CD16 se caracteriza por la presencia de una banda morada y otra azul a Rf 's de 0,26 y 0,61 respectivamente. Al comparar esos valores de retención relativa con los obtenidos de las fracciones 40 a 54 (tanto de A como de B), se observa que en general estas fracciones presentan un perfil cromatográfico similar a CD16 y muy posiblemente compartan algunas moléculas que se encuentran en ella. También cabe resaltar que la ausencia de algunas bandas o que salen tenues, podría deberse a una distribución no homogénea del agente derivatizante o a que se encuentran en una menor concentración.

Una vez comparados los perfiles cromatográficos frente a CD16, se escogieron un total de 15 fracciones para llevar acabo el ensayo enzimático con 11 $\beta$ -HSD1. Se escogieron 9 fracciones de A y 6 fracciones de B, donde se tuvo su homología con CD16, tanto como su

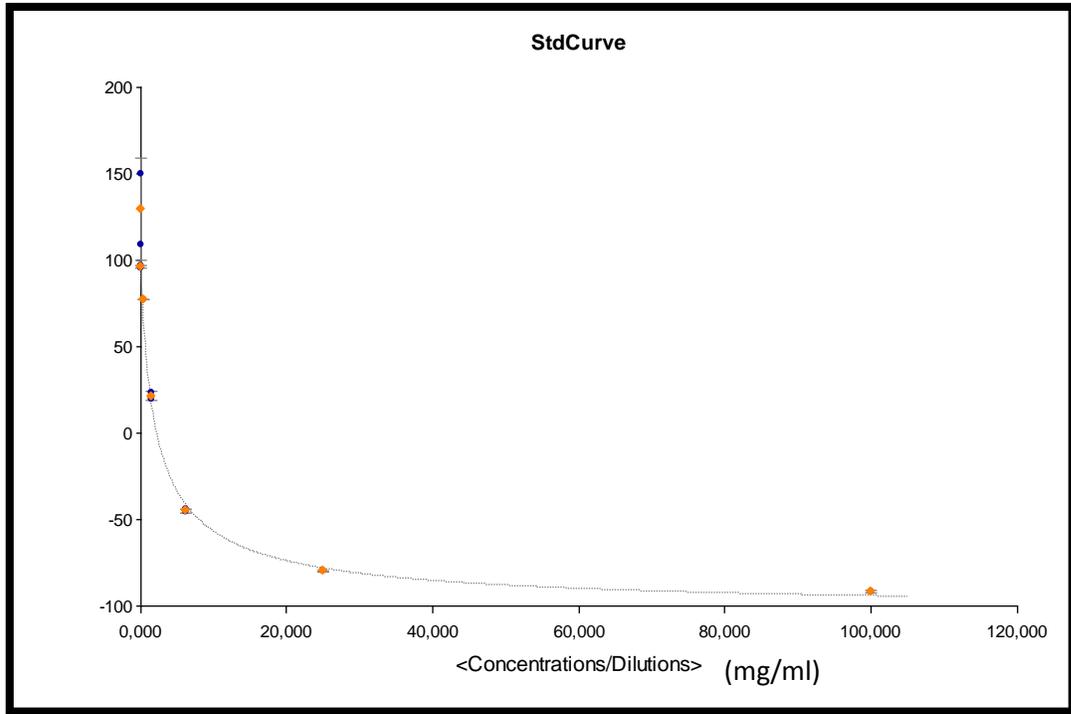
rendimiento en biomasa. A continuación, en la **Tabla 5** se muestran las fracciones escogidas para el ensayo y su peso en mg.

FRACCION	PESO (mg)
<b>40A</b>	96,7
<b>41A</b>	124,5
<b>43A</b>	114,9
<b>44A</b>	131,7
<b>45A</b>	130,3
<b>47A</b>	149,5
<b>50A</b>	99,8
<b>52A</b>	111,9
<b>53A</b>	126,8
<b>40B</b>	141,9
<b>41B</b>	62,5
<b>43B</b>	128,2
<b>45B</b>	113,8
<b>47B</b>	96,1
<b>51B</b>	142,9

**Tabla 5.** Fracciones seleccionadas para el ensayo y su peso en mg

### 4.3. ENSAYO ENZIMÁTICO CON 11 $\beta$ -HSD1 Y LECTURA DE LAS MUESTRAS

Como se mencionó anteriormente, la cuantificación de cortisol se realizó utilizando un kit de HTRF® de la marca Cisbio y se llevó a cabo la lectura del ensayo en un lector de platos, el cual de forma automática realizó el tratamiento estadístico de los datos. Se debe recordar que este ensayo se realizó con el fin de verificar la funcionalidad de los microsomas hepáticos y ver las condiciones óptimas en la que se producía cortisol. A continuación, en la **gráfica 1** se muestra la curva de calibración del ensayo enzimático sin los inhibidores y en la **Tabla 6** los datos asociados al modelo matemático al cual se ajusta la curva con el respectivo coeficiente de determinación ( $R^2$ )



**Grafica 1.** Curva de calibración ensayo enzimático. El eje Y corresponde a fluorescencia (Delta F%) y el X a concentración de cortisol en mg/ml

Curve Name	Curve Formula	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
StdCurve enzymatic essay	$Y = (A-D) / (1+(X/C)^B) + D$	125	0,802	1,82	-103	0,997

**Tabla 6.** Modelo matemático de la curva de calibración de cortisol y coeficiente de determinación.

Se obtuvo un R<sup>2</sup> de 0,997, lo cual quiere decir que la variable Delta F% que es una representación indirecta de fluorescencia proporcionada por el equipo, es explicada en un 99,7% por el modelo matemático de la **Tabla 6**. Ahora bien, en la **gráfica 1** se muestra la curva de calibración, donde en el eje Y se representa Delta F% y en el eje X se representa la concentración de cortisol en mg/ml. De acuerdo al modelo matemático se observa que hay un decaimiento exponencial debido a la relación inversa que hay entre transferencia de energía de resonancia fluorescente y concentración de cortisol en la muestra.

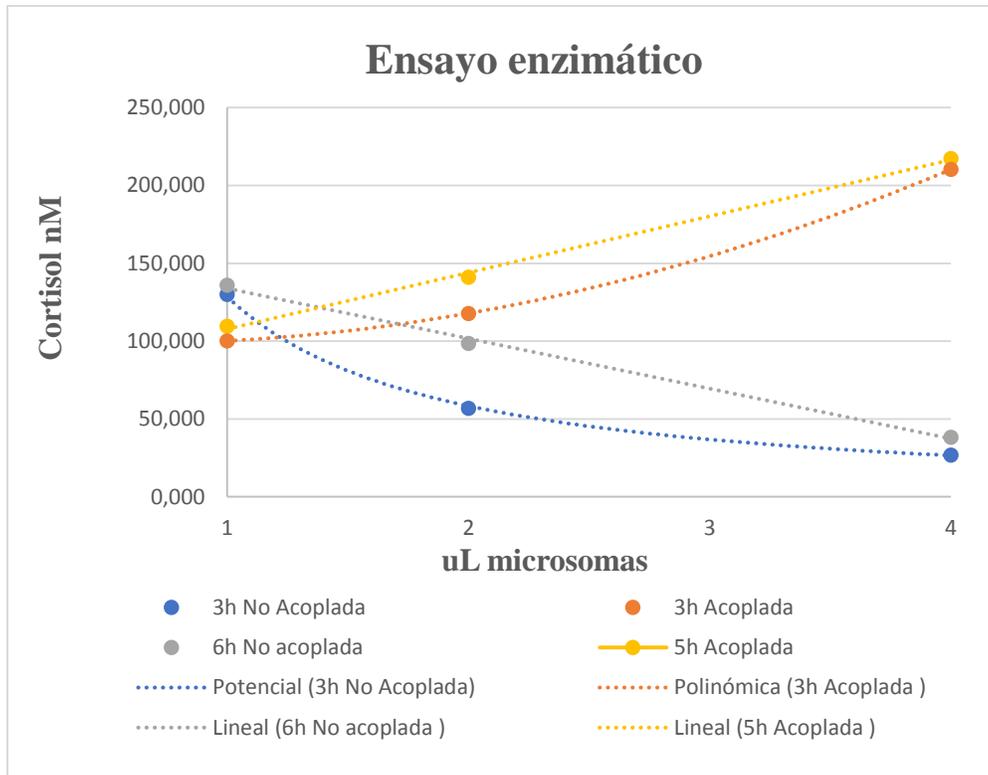
Con la ecuación de la curva (**Tabla 6**) fueron obtenidos los valores de concentración de cortisol producidos en cada uno de los ensayos enzimáticos descritos en la sección 3.5. A

continuación en la **Tabla 7** se muestra una recopilación de las concentraciones de cortisol promedio en cada uno de los ensayos, adicionalmente con esos datos se construyeron las **gráficas 2 y 3**.

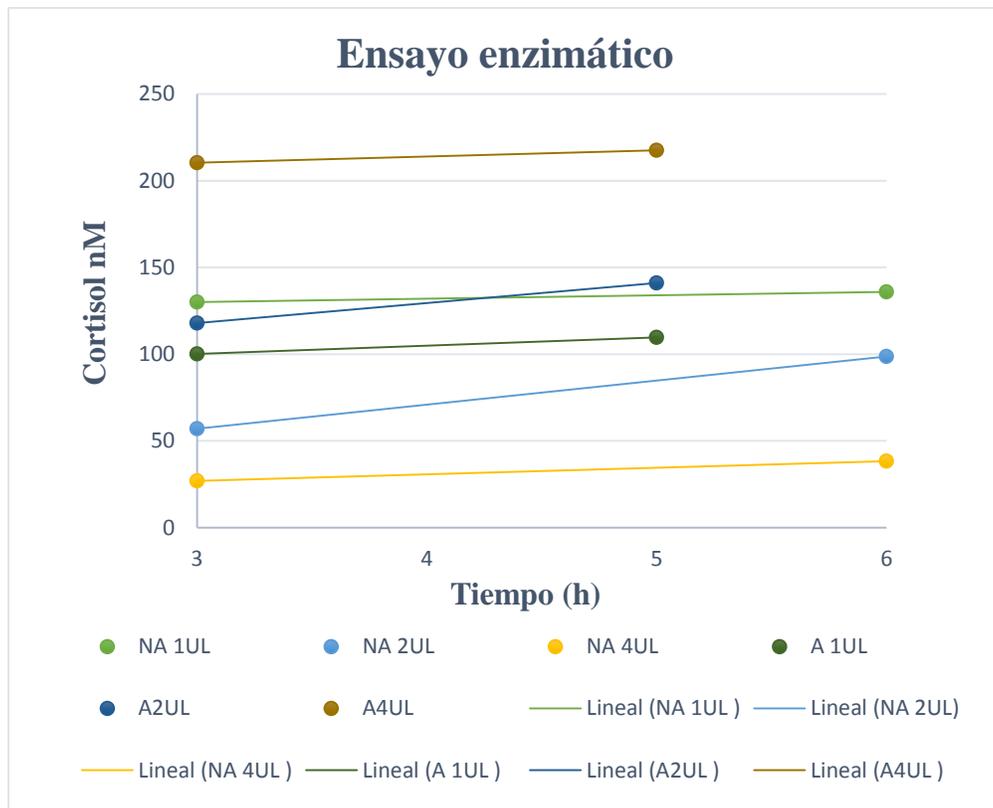
<b>Reacción enzimática</b>	<b>Volumen microsomas (µL)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Cortisol (nM)</b>
No acoplada	1	3	130,00
		6	135,95
	2	3	56,96
		6	98,58
	4	3	26,85
		6	38,37
Acoplada	1	3	100,19
		5	109,71
	2	3	117,88
		5	141,10
	4	3	210,34
		5	217,46

**Tabla 7.** Concentraciones de cortisol promedio de cada uno de los ensayos enzimáticos

De forma general al observar la **Tabla 7** se evidencia la producción de cortisol en todos los ensayos, por lo que se puede confirmar su capacidad de metabólica. En promedio se obtuvieron altos valores de cortisol (115,28nM) en comparación con los valores reportador por Mosquera y colaboradores (50nM y 100nM).



**Grafica 2.** Concentraciones de cortisol producidas en un ensayo enzimático acoplado y no acoplado a un sistema de regeneración de NADPH. El eje Y corresponde a cortisol (nM) y el X cantidad de microsomas (uL)



**Grafica 3.** Concentraciones de cortisol producidas en un ensayo enzimático acoplado y no acoplado a un sistema de regeneración de NADPH. El eje Y corresponde a cortisol (nM) y el X tiempo. NA: no acoplado A: acoplado. UL: cantidad de microsomas añadidos

Como se describió anteriormente en la sección 2.3, la enzima  $11\beta$ -HSD1 cataliza la reducción de cortisona a cortisol usando NADPH como cofactor y produciendo  $\text{NADP}^+$ , la enzima utiliza una molécula de NADPH para reducir una molécula de cortisona a cortisol, es decir que es una reacción equimolar. En algunos de los ensayos enzimáticos se acopló un sistema de regeneración de NADPH utilizando la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la cual utiliza glucosa 6 fosfato (G6P) como sustrato y  $\text{NADP}^+$  como cofactor para producir 6 fosfogluconolactona y NADPH, así el  $\text{NADP}^+$  producido en la reacción, es usado por la G6PDH para regenerar el NADPH (ver **figura 1**). La intención es mantener un leve exceso de NADPH de forma continua y favorecer la producción del cortisol a lo largo del tiempo.

La **gráfica 3** muestra la relación entre cortisol producido (eje Y) y el tiempo (eje X), donde se observa que en cada reacción siempre hay un aumento en la producción de cortisol a medida que el tiempo transcurre. Es decir, la reacción a las 6h tendrá más cortisol comparado a 3h. Se podría indicar que ese comportamiento se debe a que al cabo de 6h aún existe NADPH en la reacción, favoreciendo la reducción del sustrato. Aunque las reacciones no acopladas (NA) no tengan esa regeneración de NADPH de forma continua como se describió anteriormente, se puede decir que ese exceso en el que se añade NADPH es suficiente para que aun a las 6h se produzca cortisol.

En cuanto a la **gráfica 2**, esta muestra la relación entre cortisol producido (eje Y) y la cantidad de microsomas (eje X) en cada reacción, que finalmente se traduce a cantidad de enzima  $11\beta$ -HSD1. Lo que se puede observar es que las reacciones acopladas presentan una mayor producción de cortisol a medida que se aumenta la cantidad de enzima agregada a la mezcla de reacción. Por el contrario, en las reacciones no acopladas la producción de cortisol se vio afectada por el aumento de la cantidad de enzima presente en la mezcla de reacción.

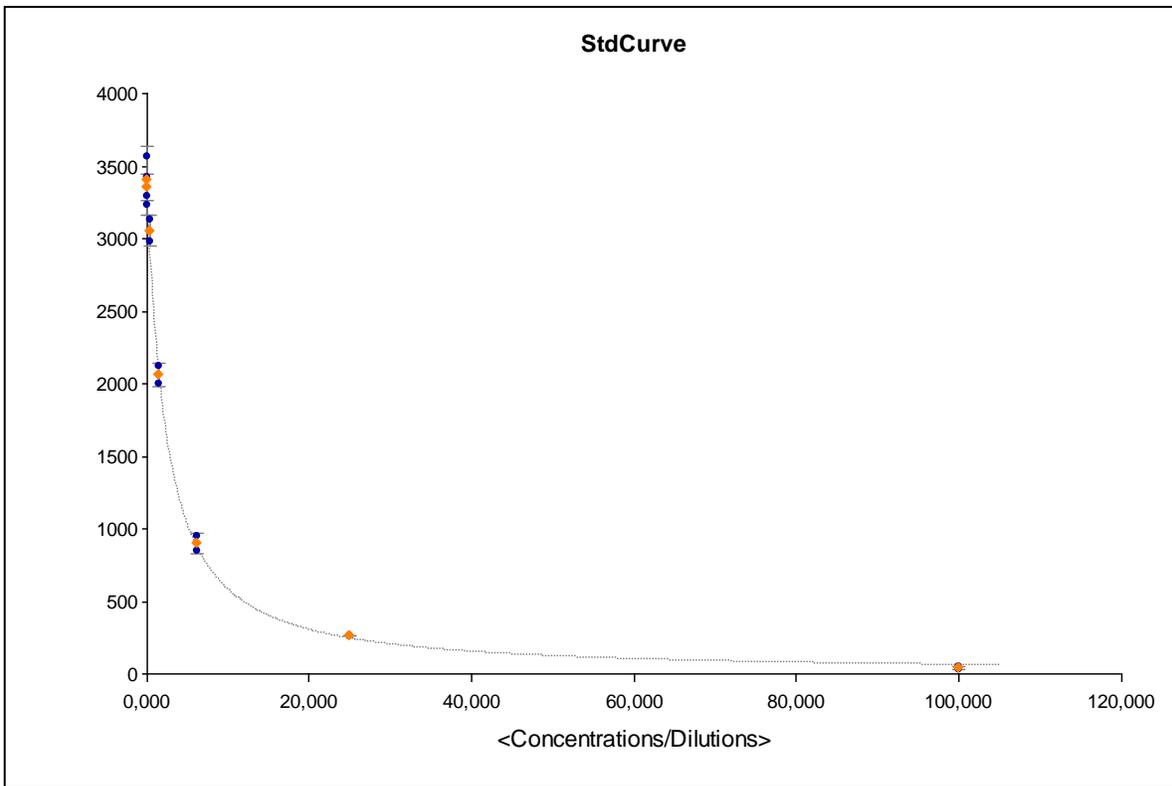
Lo anterior se puede explicar con el efecto del sistema de regeneración de NADPH, el cual asegura que la enzima  $11\beta$ -HSD1 tiene la cantidad suficiente de cofactor para mantener su actividad reductasa a lo largo del tiempo, inclusive si se aumenta la cantidad de proteína. Por el contrario, cuando se añade un exceso de cofactor y aumenta la cantidad de proteína, esta va requerir más NADPH para ejercer su actividad y en consecuencia habrá una disminución en las concentraciones de cortisol, pues al no disponer de NADPH la reacción se revierte

hacia la vía oxidasa convirtiendo el cortisol a cortisona, observándose menores producciones de cortisol para los ensayos no acoplados

Debido a la explicación anterior se decidió mantener el sistema de regeneración del cofactor NADPH en todos los ensayos de inhibición. Adicionalmente, se decidió realizar los ensayos de inhibición con 3µL de microsomas, pues se obtiene una concentración de cortisol alta la cual se requiere en los ensayos. En cuanto al tiempo de incubación, se decidió tomar el de 3h pues Mosquera demostró mediante un seguimiento de la reacción que durante las 3h había un comportamiento lineal entre la cantidad de cortisol producido y el tiempo, factor que es importante en un estudio de inhibición.

#### **4.4. ENSAYO ENZIMÁTICO DE INHIBICIÓN CON 11β-HSD1**

Una vez comprobada la funcionalidad de los microsomas hepáticos, se procedió a realizar el ensayo enzimático de inhibición con las 15 fracciones de TP obtenidas anteriormente. Este ensayo fue realizado con el fin de evaluar la capacidad inhibitoria de los TP sobre la enzima. La cuantificación de cortisol y su respectiva medición se realizó de igual forma a la descrita en la sección 4.3. A continuación, en la **gráfica 4** se muestra la curva de la calibración del ensayo enzimático de los inhibidores y en la **Tabla 8** los datos asociados al modelo matemático al cual se ajusta la curva con el respectivo coeficiente de determinación ( $R^2$ ).



**Grafica 4.** Curva de calibración ensayo enzimático inhibición. El eje Y corresponde a fluorescencia (Delta F%) y el X a concentración de cortisol en mg/ml

Curve Name	Curve Formula	A	B	C	D	R2
StdCurve inhibition essay	$Y = (A-D) / (1+(X/C)^B) + D$	3,44E+03	1,1	2,35	13,6	1

**Tabla 8.** Modelo matemático de la curva de calibración de cortisol y coeficiente de determinación.

Se obtuvo un  $R^2$  de 1,0, lo cual quiere decir que la variable Delta F% es explicada en un 100% por el modelo matemático de la **Tabla 8**. En la **gráfica 4** se muestra la curva de calibración para el ensayo de inhibición, donde el eje Y representa Delta F% y el eje X se representa la concentración de cortisol en mg/ml y se observa la relación inversa entre ambas variables que se explicó anteriormente. En un ensayo de inhibición es de vital importancia tener un control positivo que inhiba el blanco de interés. En el caso de este estudio, el control utilizado fue la carbenoxolona que como se discutió en la sección 2,5 es un antiinflamatorio inhibidor no selectivo de  $11\beta$ -HSD. A continuación, en la **Tabla 9** se muestran las concentraciones de

cortisol producidas en presencia de carbenoxolona y para una reacción enzimática sin inhibidor

Reacción enzimática	Concentración cortisol (nM)
Reacción enzimática en presencia de carbenoxolona	579,37 nM
Reacción enzimática sin inhibidor	159,51 nM

**Tabla 9.** Concentraciones de cortisol producidas en ensayo enzimático con y sin inhibidor

En la literatura<sup>2</sup> se reporta como la carbenoxolona provoca una disminución en la producción de cortisol a causa de la inhibición de  $11\beta$ -HSD1. La **Tabla 9** muestra en primera medida, que no hubo inhibición por parte de la carbenoxolona, y en segunda medida que la cantidad de cortisol producida es muchísimo más alta en comparación con una reacción normal (sin inhibidor). Estos resultados desafortunadamente invalidan este ensayo en particular, ya que no hay forma de hacer comparaciones entre muestras y controles.

Ahora bien, se realizó una búsqueda exhaustiva de los posibles errores cometidos en la realización del ensayo, sin embargo, se llegó a la conclusión de que únicamente se modificaron tres aspectos del protocolo descrito Mosquera<sup>2</sup> debido a los resultados descritos en la sección 4.3. El primer cambio fue en la cantidad de microsomas utilizados, Mosquera en su protocolo utilizaba  $1\mu\text{L}$ , por el contrario en estos ensayos se utilizaron  $3\mu\text{L}$  pues como se muestra en la **gráfica 3** a esa cantidad de microsomas hay producciones altas de cortisol, las cuales se requieren para un ensayo de inhibición. El segundo cambio que fue consecuencia del primero, fue un cambio en la cantidad de enzima G6PDH, en el protocolo estandarizado se utilizaba  $2,6\mu\text{L}$ , en estos ensayos de inhibición se utilizaron  $5,6\mu\text{L}$  pues al aumentar la cantidad de microsomas, también se debe aumentar la cantidad de G6PDH para que la cantidad de cofactor NADPH sea suficiente y se mantenga la actividad reductasa.

Finalmente, el último cambio que fue más que todo un error experimental, fue el tiempo de incubación de la reacción enzimática que contenía carbenoxolona, el cual fue de 2h en vez de 3h sin embargo, ese cambio no es suficiente para que las concentraciones de cortisol estén tan elevadas. El error más representativo apunta hacia la carbenoxolona, si bien este es un compuesto con una alta estabilidad se recomienda para futuros ensayos realizar una valoración del contenido por HPLC.

## 5.0 CONCLUSIONES

5.1 Haciendo uso de la planta piloto de extracción se aseguró el agotamiento del material vegetal, utilizando como solvente diclorometano/acetato de etilo y obteniendo un extracto crudo del material vegetal, facilitando su posterior fraccionamiento

5.2 Mediante cromatografía preparativa se logró purificar un conjunto de fracciones correspondientes a triterpenos pentacíclicos y por medio de TLC se compararon sus perfiles cromatográficos frente a la fracción hit CD16, donde se obtuvieron 15 fracciones con perfil similar a CD16

5.3 La cromatografía preparativa es una técnica con una alta robustez y reproducibilidad, que permite purificación de compuestos a partir de muestras líquidas o sólidas sin preparación previa

5.4 El sistema de regeneración del cofactor NADPH muestra ser efectivo en los ensayos enzimáticos para la producción de cortisol, obteniéndose concentraciones entre 100 nM y 200nM transcurridas 6h de reacción

5.5 El kit HTRF® es un método de detección para cuantificar cortisol altamente sensible y selectivo, con límites de detección bajos de cortisol (0,22nM) que permite una cuantificación acertada del mismo.

5.6 Los ensayos enzimáticos de inhibición fueron invalidados debido a discrepancias en el control de carbenoxolona, por lo cual no se puede analizar los datos de este ensayo

## 6.0 RECOMENDACIONES

6.1 Se recomienda tomar gran cantidad de material vegetal, pues durante los procesos de reducción de tamaño de partícula y extracción se pierde gran cantidad.

6.2 Se podría buscar otra alternativa para reducir el tamaño de partícula del material vegetal pues, aunque con la lijadora de disco se obtiene un tamaño muy pequeño, se pierde gran cantidad de muestra.

6.3 Al realizar el proceso de derivatización con aspersion manual hace que el revelado no sea uniforme, por lo que se recomienda una alternativa para realizar este proceso de una forma más automatizada

6.4 Para los ensayos enzimáticos de inhibición se recomienda realizarlos con 1 $\mu$ L y 3 $\mu$ L de microsomas hepáticos y analizar las diferencias en las producciones de cortisol.

6.4 Se recomienda realizar una valoración previa de la carbenoxolona mediante HPLC y si es posible cuantificar las impurezas asociadas a la misma.

## 7. REFERENCIAS

1. Rang, H., Ritter, J. . & Flower, R. . *Farmacologia*. (2010).
2. Mosquera, C. Biblioteca química de moléculas derivadas de raíces de *Cecropia telenitida* y su evaluación como fuente de moléculas inhibitoras de la enzima 11B-HSD1. (ICESI, 2017).
3. Zhang, J.-H., D, T. & Oldenburg, K. A simple statistical parameter for use in evaluation and Validation of High Throughput screening assay. *J. Biomol. Screen.* **4**, (1999).
4. Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* **13**, 894–901 (2008).
5. Qin, C. *et al.* What Does It Take to Synergistically Combine Sub-Potent Natural Products into Drug-Level Potent Combinations? *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
6. Gertsch, J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: Forth and back to intelligent mixtures. *Planta Med.* **77**, 1086–1098 (2011).
7. OMS. *Informe Mundial sobre la diabetes. Informe Mundial Sobre La Diabetes* (2016).
8. Salud, M. D. E. Guia de atencion de la diabetes tipo ii.
9. Lorena Mosso G, Cristian Carvajal M, C., Auristela Rojas O, Alexis González P, A. B. M. & Joaquín Montero L, C. F. B. Actividad de 11 beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 en hipertensos chilenos. *Rev. Med. Chil.* **130**, 1201–1208 (2002).
10. Tomlinson, J. W. & Stewart, P. M. Mechanisms of disease: Selective inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a novel treatment for the metabolic syndrome. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **1**, 92–99 (2005).
11. Inzucchi, S. E. & Sachin, M. Terapias Actuales para el Manejo Médico de la Diabetes. *ob* 1–21 (2016). doi:10.1097/AOG.0000000000001332
12. Pct, D. E. P. Compuestos inhibidores de 11beta-hidroxisteroide deshidrogenasa de tipo 1 La presente invención se refiere a derivados de perhidroquinolina y perhidroisoquinolina y métodos de tratamiento de ciertas enfermedades usando tales compuestos . *ESTADO DE LA TÉC.* **1**, (2010).
13. Montoya, G., Balcazar, N., Tabares, J., Gonzalez, P. & Ramirez, J. Hypoglycemic activity of serjanic acid obtained from *Cecropia telenitida*. *23 SILAE Congr.* **2**, 183 (2014).
14. Lok, A. F. S. L., Tan, K., Chong, K. Y., Nghiem, T. P. L. & Tan, H. T. W. The distribution and ecology of *Cecropia* species (Urticaceae) in Singapore. *Nat. Singapore* **3**, 199–209 (2010).
15. Guillermo, M., Jelver, S., Fernando, A. & Ulrike, H. Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells. *Rev. Bras. Farmacogn.* **23**, 7 (2013).

16. Catalan, V. *et al.* Proinflammatory cytokines in obesity: Impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. *Obes. Surg.* **17**, 1464–1474 (2007).
17. Degorce, F. *et al.* HTRF : A Technology Tailored for Drug Discovery – A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. 22–32 (2009).
18. Plantas, L. D. E., Aceptadas, M. & Fines, C. O. N. Plantas medicinales aprobadas por INVIMA. (2017).
19. Wagner, H., Blatt, S. & Rickl, V. *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas.*

