

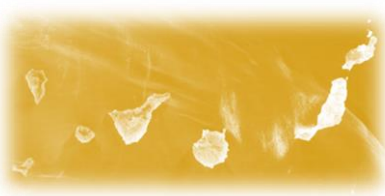
Bloque III 2ª parte:

Ejemplos de estudios bio-guiados frente a *Leishmania* sp.,
Trypanosoma cruzi y *Acanthamoeba*

Dr. José Piñero

Dra. Ines Sifaoui

Dra. Atteneri López



Estudio de *Withania aristata*

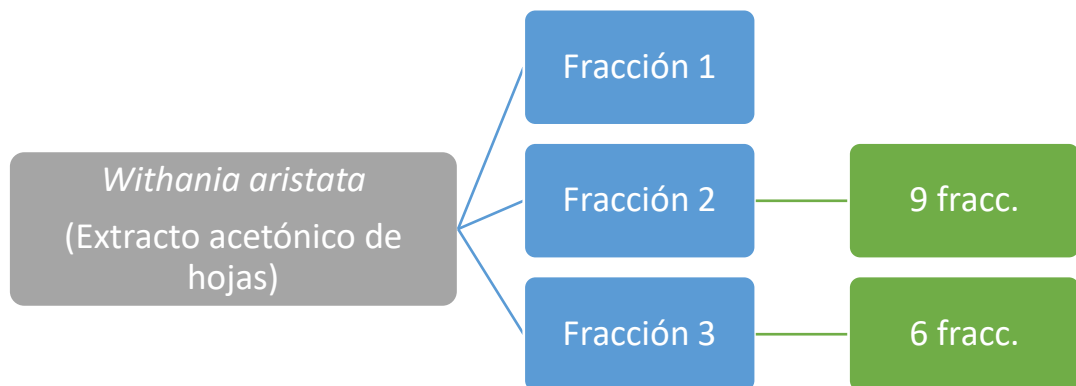


Extracto	<i>L. amazonensis</i> IC ₅₀ (µg/ml)	<i>L. donovani</i> IC ₅₀ (µg/mL)	<i>Trypanosoma cruzi</i> IC ₅₀ (µg/ml)	Macrófagos murinos CC ₅₀ (µg/mL)
1er extracto	2.87	20.25	12.78	42.63
Fracción 1	12.27 ± 1.95	19.12 ± 1.67	28.91 ± 5.27	81.39 ± 10.04
Fracción 2	1.02 ± 0.12	12.73 ± 0.43	1.12 ± 0.05	11.22 ± 1.67
Fracción 3	4.53 ± 0.53	22.28 ± 3.70	3.63 ± 0.38	46.11 ± 8.83

Presenta actividad diurética, fitotóxica y citotóxica frente a células tumorales humanas.

En medicina tradicional de las islas: cicatrizante. problemas reumáticos. oculares y otitis.
insomnio y patologías urinarias.

Estudio de *Withania aristata*



- Se evaluaron los extractos de hexanos y acetona de las hojas de *Withania aristata*, siendo el segundo más activo.
- El extracto de acetona se sometió a cromatografía líquida al vacío sobre gel de sílice, obteniéndose tres fracciones.
- Las fracciones más activas, se cromatografiaron posteriormente en una columna de gel de sílice, obteniéndose siete y seis subfracciones, respectivamente.
- La subfracción F2D se sometió a pasos de purificación, obteniendo los conocidos withanólidos 1-3. La subfracción F2E después de la TLC preparatoria produjo el compuesto 1. Y la subfracción F3D se sometió a la TLC preparatoria, obteniendo los withanólidos 2 y 3.

Fracc	<i>Trypanosoma cruzi</i> IC ₅₀ (µg/ml)	<i>Leishmania amazonensis</i> IC ₅₀ (µg/ml)
F2-1	11.23	1.37
F2-2	1.93	1.05
F2-3	3.14	1.40
F2-5	1.73	0.36
F2-7	2.02	0.19
F2-8	5.74	2.11
Ref	6.48 ± 0.24	6.94 ± 1.94

Fracc	<i>Trypanosoma cruzi</i> IC ₅₀ (µg/ml)	<i>Leishmania amazonensis</i> IC ₅₀ (µg/ml)
F3-A	8.42	2.51
F3-B	6.04	2.48
F3-C	5.56	2.35
F3-D	3.59	1.01
F3-E	7.05	3.42
F3-F	-	19.52

Estudio de *Withania aristata*

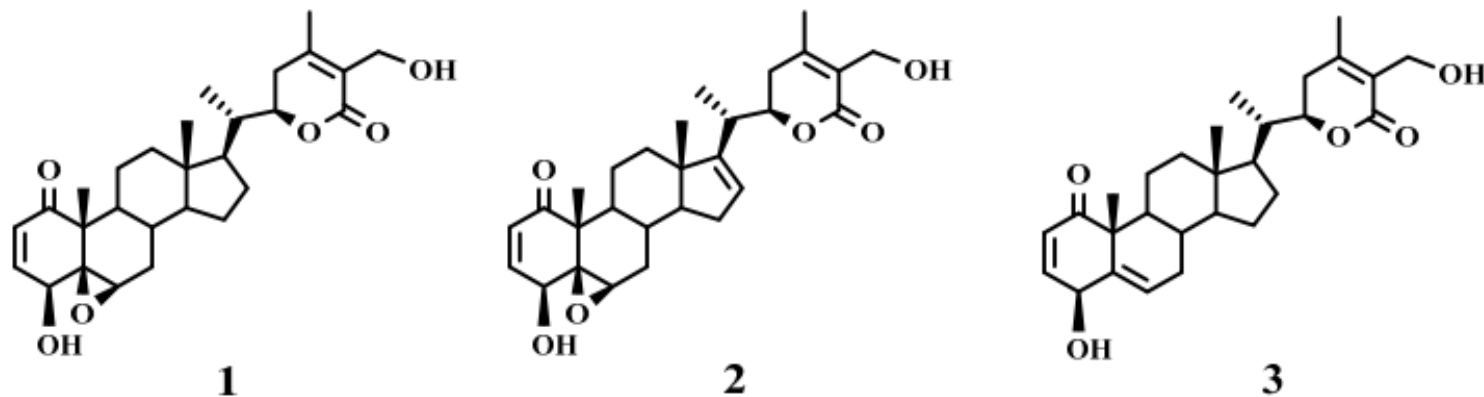


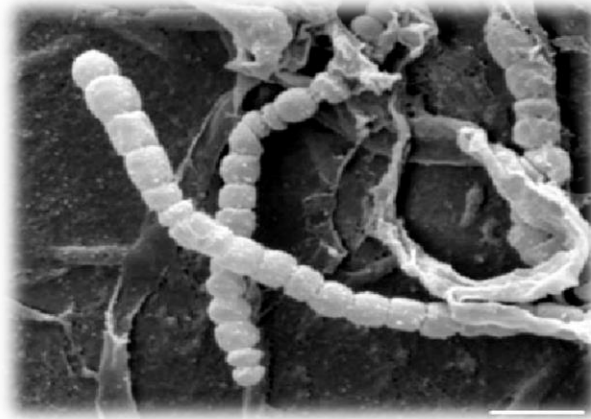
Figure 1. Chemical structure of withanolides 1–3 isolated from *Withania aristata*.

Table 2. Activity of withanolides 1–3 against the promastigote stage of *Leishmania*, epimastigote stage of *T. cruzi* and cytotoxicity against eucariotic cells.

Cp	<i>L. amazonensis</i> IC ₅₀ (μM ± SD) ^a	SI	<i>L. donovani</i> IC ₅₀ (μM ± SD)	SI	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (μM ± SD)	SI ^c	Murine Macrophages CC ₅₀ (μM) ^b
1	0.83 ± 0.07	14.36	13.22 ± 1.16	0.91	1.02 ± 0.10	11.69	11.92 ± 1.08
2	27.37 ± 1.03	3.12	>50		14.68 ± 0.43	5.82	85.47 ± 6.00
3	2.82 ± 0.07	4.35	20.88 ± 1.33	0.59	2.41 ± 0.11	5.09	12.26 ± 1.16
M ^d	6.48 ± 0.10	11.14	3.31 ± 0.11	21.81			72.18 ± 1.25
B ^d					6.95 ± 0.50	57.54	399.91 ± 1.04

^a IC₅₀: concentration able to inhibit 50% of parasites, expressed as μM ± standard deviation (SD). ^b CC₅₀ concentration able to inhibit 50% of murine macrophages, expressed as μM ± standard deviation (SD). ^c SI: selectivity index (CC₅₀/IC₅₀). ^d M: miltefosine, B: benznidazole were used as the positive controls. Cp: Compounds.

Actinomycetes



> 10000
moléculas
bioactivas

- ◆ Antibacteriana
- ◆ Antioxidante
- ◆ Antiviral
- ◆ Anticáncer

75%
de
Streptomyces

25%
de otros
actinomycetes

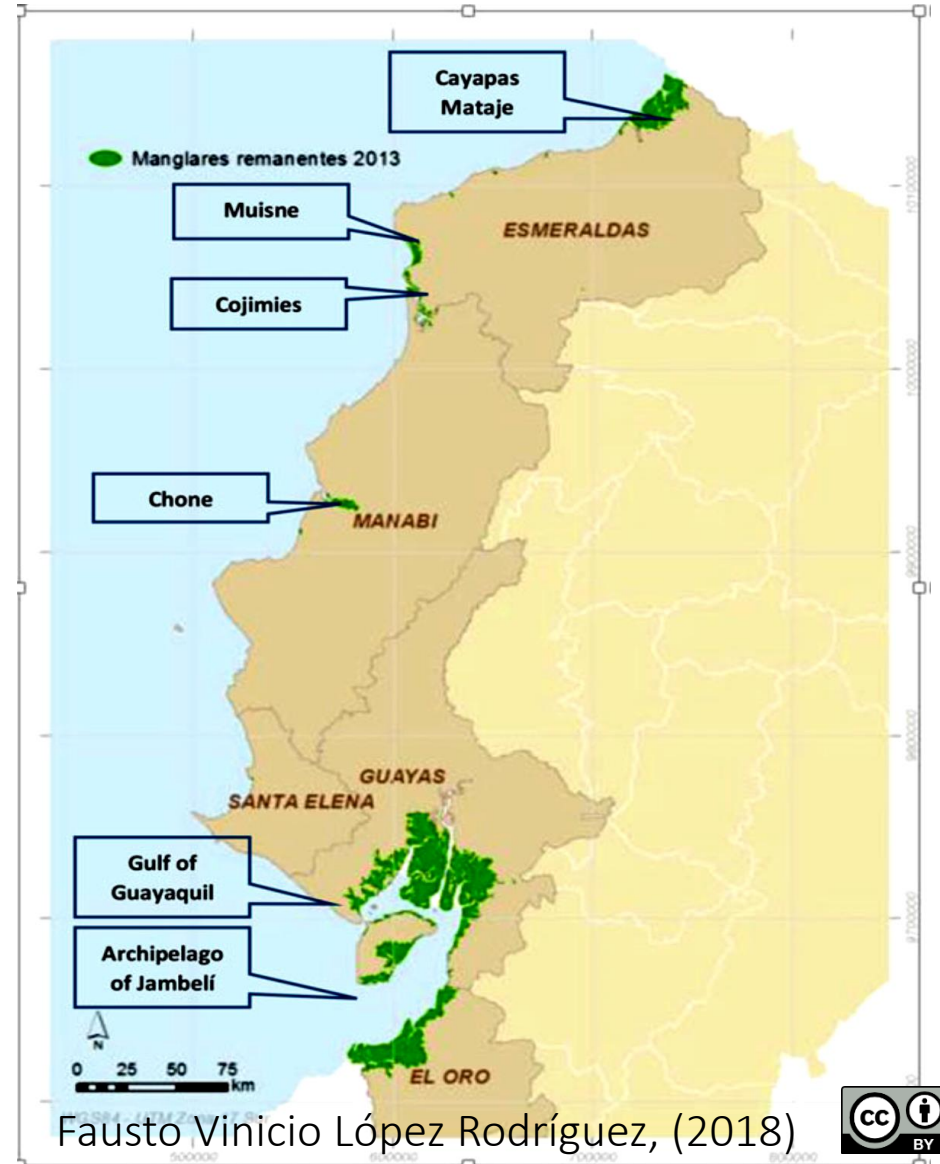
Solecka et al, (2012)

Aislamiento de 19 *Streptomyces* y *Micromonospora* diferentes

Manglar Jambeli



Cartuche et al, (2019)



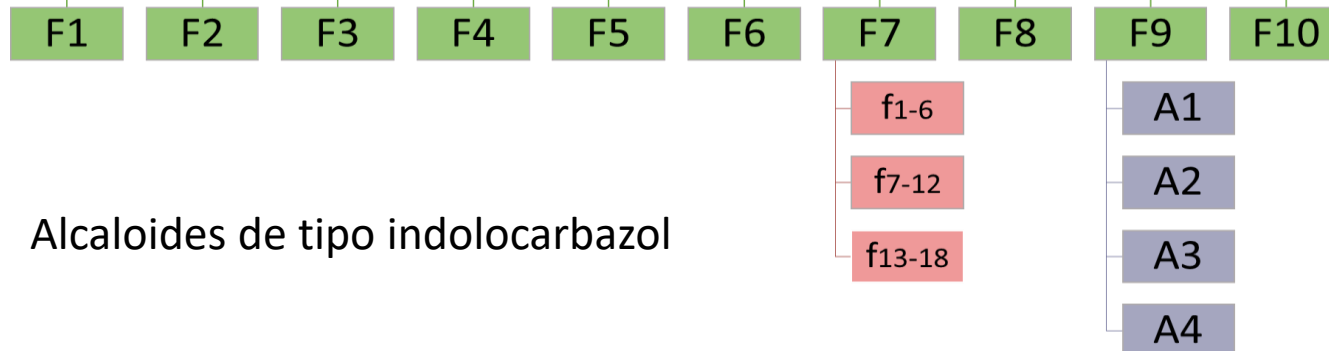
Extractos de sobrenadante de microorganismos marinos

19 Extractos de diferentes microorganismos

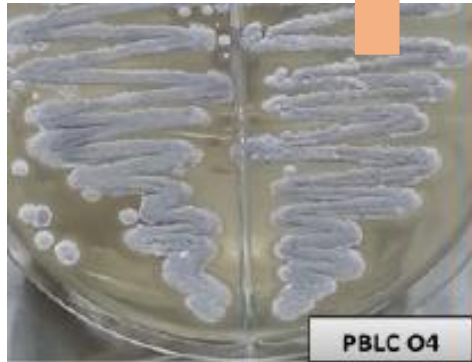
Se seleccionó la más activa frente a ambos parásitos

Streptomyces sanyensis
(PBLC04)

PBLC-04



Streptomyces sanyensis

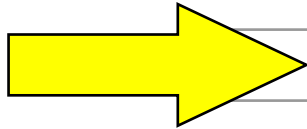


Cultivo en botellas de Fernbach

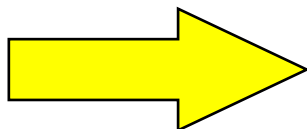


Streptomyces sanyensis

Fracciones	CI ₅₀		CC ₅₀
	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	Citotoxicidad
PBLC-04	0,57 ± 0,08	2,79 ± 0,19	4,05 ± 0,47
F6	0,977 ± 0,123	3,628 ± 0,021	>100
F7	0,432 ± 0,078	4,237 ± 0,279	8,920 ± 1,706
F8	0,175 ± 0,030	3,899 ± 0,328	6,220 ± 0,716
F9	0,088 ± 0,004	23,976 ± 3,101	26,934 ± 4,526
F10	0,104 ± 0,022	3,682 ± 0,021	5,668 ± 0,278



Fracciones de F9	CI ₅₀		CC ₅₀
	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	Citotoxicidad
A1	16,080 ± 2,080	s/a	>100
A2	11,405 ± 1,431	100 - 50	>100
A3	2,188 ± 0,428	5,828 ± 0,559	>100
A4	0,031 ± 0,007	0,471 ± 0,084	4,677 ± 1,093



Fracciones de F7	CI ₅₀		CC ₅₀
	<i>L. amazonensis</i>	<i>T. cruzi</i>	Citotoxicidad
f1-6	0,280 ± 0,029	1,712 ± 0,214	45,989 ± 11,452
f7-12	0,065 ± 0,008	3,188 ± 0,321	8,049 ± 0,887
f13-18	0,072 ± 0,007	5,833 ± 0,435	9,692 ± 1,620

Streptomyces sanyensis

Table 1. Antikinetoplastid activity of ICZ metabolites isolated from *Streptomyces sanyensis* (1-4) and commercial ICZs (5-9) against *Leishmania* and *Trypanosoma* species. IC₅₀ values are reported in μM concentrations (Mean concentration ± SD).

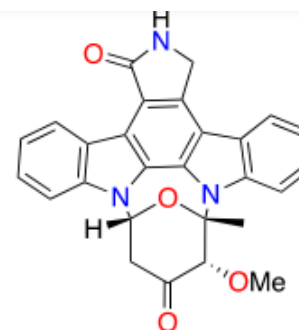
Compounds	<i>L. amazonensis</i> IC ₅₀ (μM)	<i>L. donovani</i> IC ₅₀ (μM)	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (μM)
1 STS	0.08 ± 0.02	2.07 ± 0.14	3.63 ± 0.77
2 7OSTS	3.58 ± 1.10	0.56 ± 0.06	1.58 ± 0.52
3 4'D4'OSTS	17.10 ± 4.78	> 40	17.10 ± 1.64
4 SCZ B	10.44 ± 0.21	> 40	12.50 ± 2.06



Staurosporine (STS, 1)



7-Oxostaurosporine (7OSTS, 2)



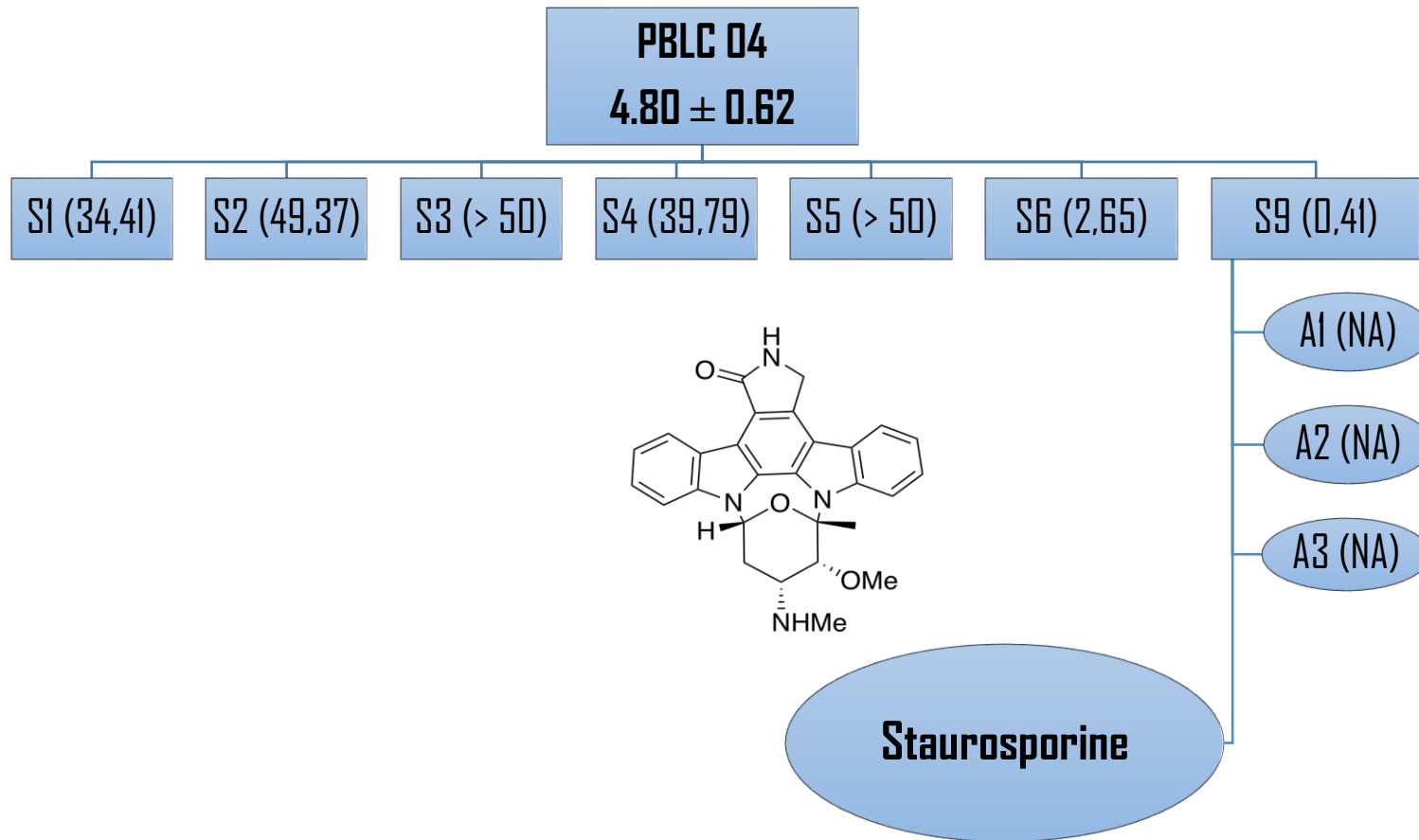
4'-Demethylamine-4'-oxostaurosporine
(4'D4'OSTS, 3)



Streptocarbazole B (SCZ B, 4)

Streptomyces sanyensis

Mismo estudio en *Acanthamoeba*:

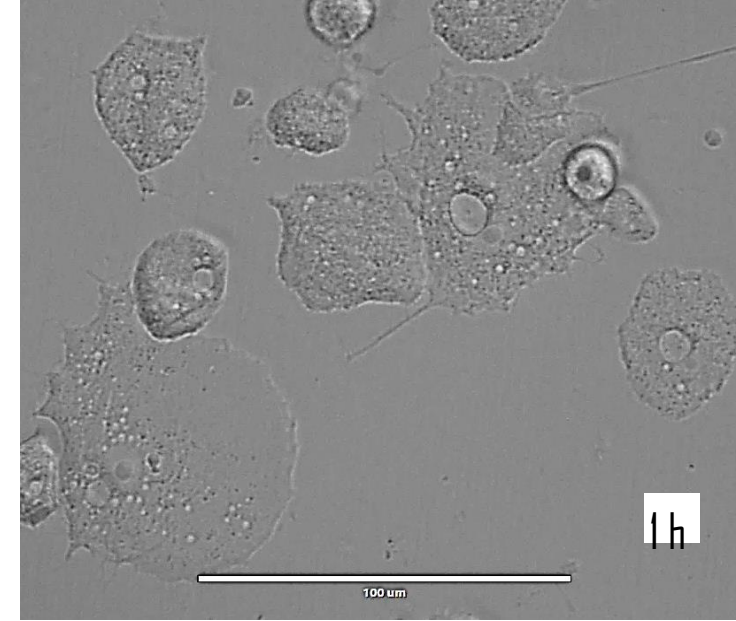
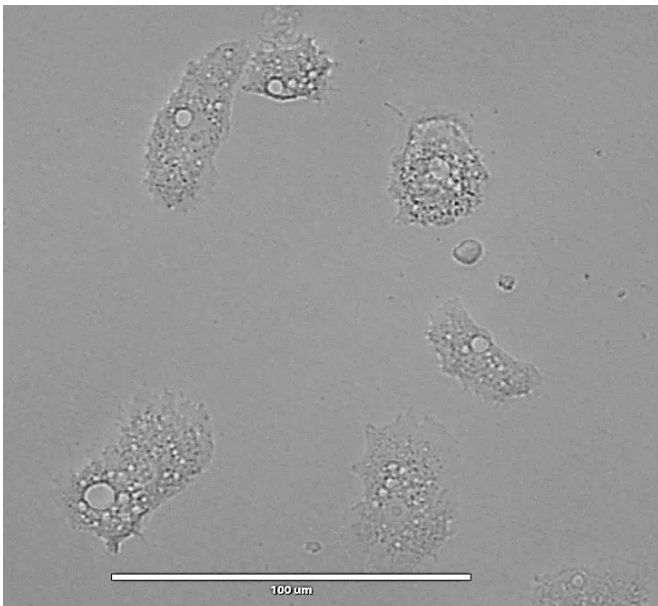


Streptomyces sanyensis

Mismo estudio pero en *Acanthamoeba*:

Compound	Trophozoite		Cyst
	IC ₅₀ μ M	IC ₉₀ μ M	IC ₅₀ μ M
Staurosporine	0.57 \pm 0.12	2.70 \pm 0.01	1.65 \pm 0.02

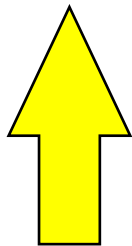
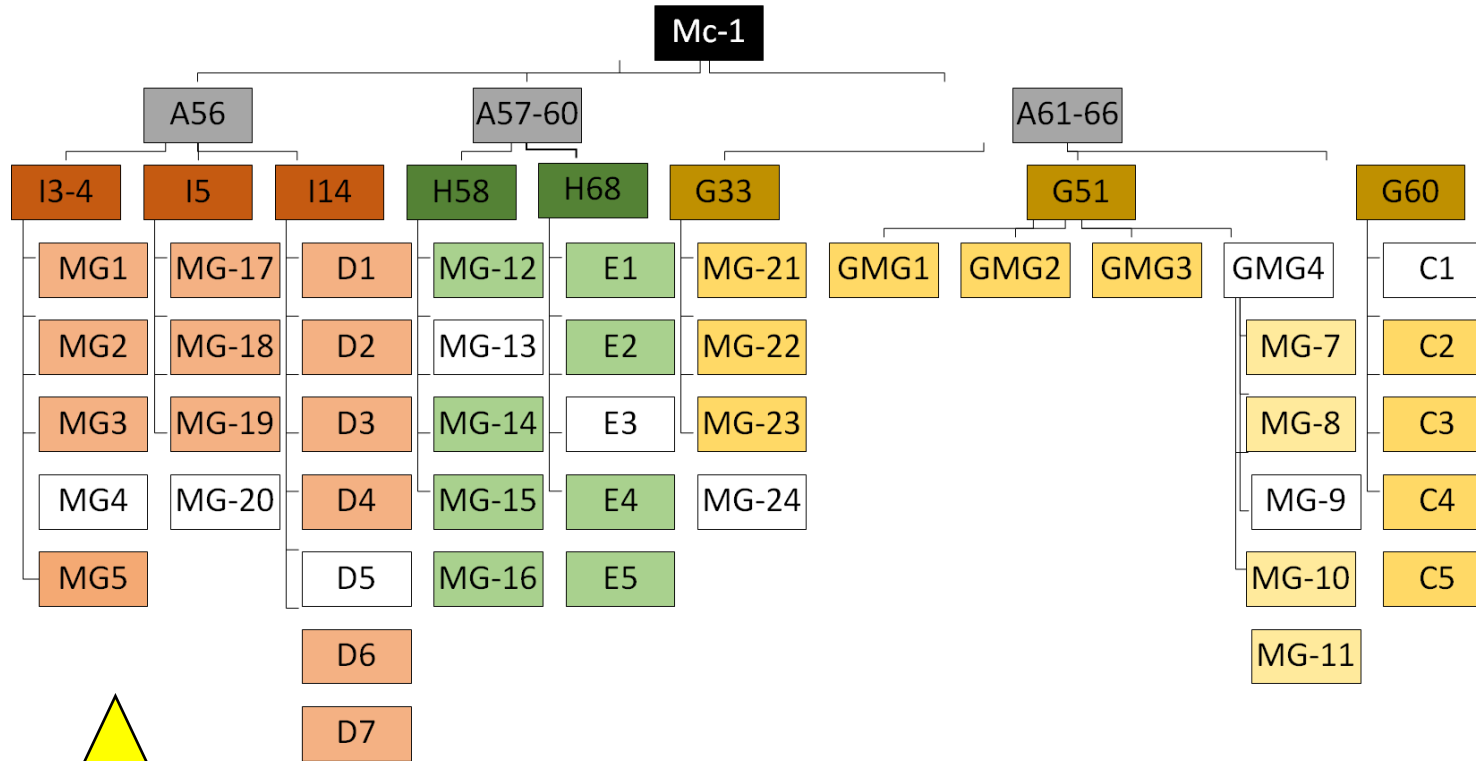
Compound	<i>A. griffini</i> IC ₅₀ μ M	<i>A. polyphaga</i> IC ₅₀ μ M	Murine macrophages CC ₅₀ μ M
Staurosporine	0.97 \pm 0.12	2.25 \pm 0.42	8.74 \pm 0.72



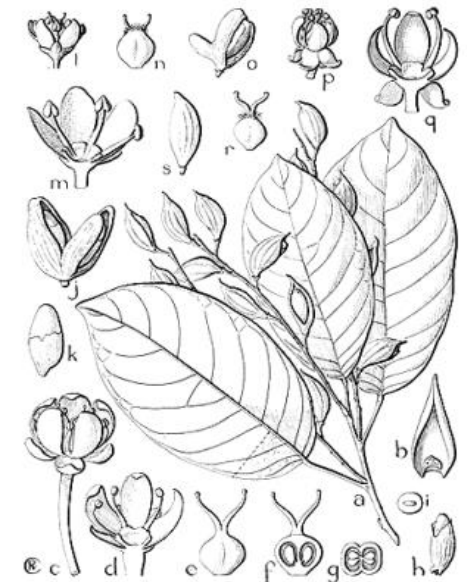
**Effect of Staurosporine
(43μM) on Neff using light
microscopy**

Images were obtained using an EVOS FL Cell Imaging System AMF4300, Life Technologies, USA (40X).

Maytenus chiapensis Lundell



Estudio bio-guiado frente a trypanosomátidos



Núñez et al., 2021

Maytenus chiapensis Lundell

- El extracto hexano-Etilacetato de la corteza de la raíz de *M. chiapensis* se ensayó contra los promastigotes de *Leishmania amazonensis* y el estadio de epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.
- También se evaluó la citotoxicidad en macrófagos murinos en busca de selectividad.
- Tras el cribado preliminar, el extracto activo se sometió a un procedimiento de fraccionamiento guiado por bioensayos dónde se fraccionó por cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con mezclas de polaridad creciente de hexanos-CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-EtOAc,
- Se obtuvieron sesenta y seis fracciones que se combinaron en base a su perfil cromográfico en capa fina (TLC) en ocho fracciones (F1 a F8).
- Una fracción activa se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-EtOAc, 10:0 a 7:3) para obtener quince subfracciones, que se combinaron sobre la base de su análisis TLC en cinco subfracciones (F6A a F6E).
- Otra subfracción se sometió a cromatografía en columna (CC) sobre Sephadex LH-20 (hexanos-CHCl₃-MeOH, 2:1:1) para dar seis subfracciones (F6B1 a F6B6) según el patrón de TLC.
- Una subfracción se purificó aún más mediante TLC preparativa (PTLC) con hexanos-EtOAc (1:1) como eluyente para obtener tres de los celastrolídeos puros.

Estudio bio-guiado frente a trypanosomátidos:

tras llegar a aislar los compuestos activos puros, se comparan con los compuestos de referencia.

	Compuesto	<i>L. amazonensis</i> CI ₅₀ (µg/mL)	<i>Trypanosoma cruzi</i> CI ₅₀ (µg/mL)	Macrófagos murinos CC ₅₀ (µg/mL)	Índice de Selectividad
COMPUESTOS PUROS aislados a partir de diferentes fracciones	MG-25	0,19±0,00	1,14±0,02	10,55±1,27	55,5 (L.a.)
	MG-27	0,96±0,13	50-25	>100	>104 (L.a.)
	MG-28	3,07±0,53	50-25	>100	>32,6 (L.a.)
	MG-29	10,72±0,18	100-50	>100	>9,3 (L.a.)
	MG-30	4,91±1,07	100-50	34,80±7,50	7,1 (L.a.)
	MG-A ₁₋₅	0,52±0,05	1,59±0,21	9,70±0,43	18,65 (L.a.)
	Miltefosina	2,64	-	29,42	11,1 (L.a.)
	Benznidazol	-	1,81	104,1	57,5 (T.c.)

Compuestos de tipo
nor triterpenometilen
quinona



Estructuras conocidas



Sin actividad
antiparasitaria
conocida

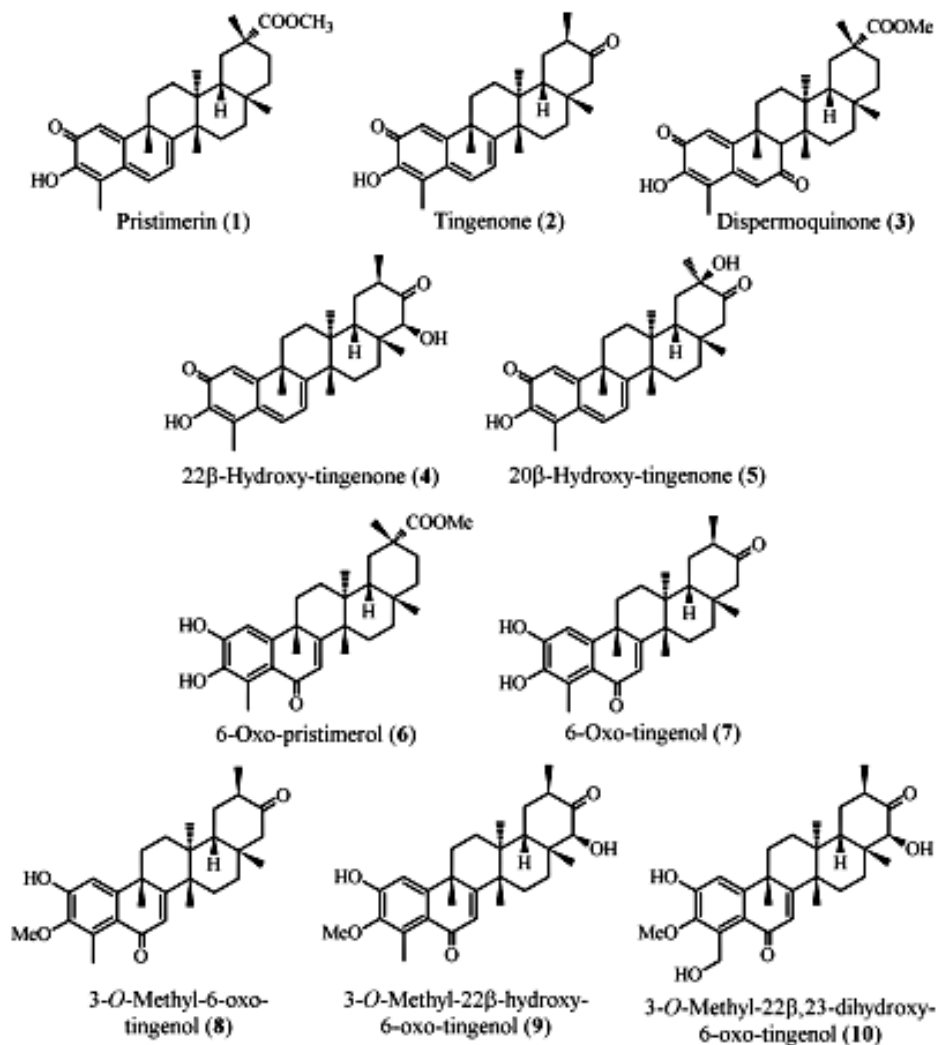


FIG 2 Chemical structures of celastroloids 1 to 10 isolated from *M. chiapensis* roots through bioguided fractionation.

Laurencia spp.

Algas Rojas

Compuestos Activos

- Sesquiterpenos
- Diterpenos
- Triterpenos
- Acetogenina C15

Actividad Biológica

- Citotoxicidad
- Antibacteria
- Antifúngica
- Antiviral
- Insecticida
- **Antiparasitaria??**

 Universidad
de La Laguna



Laurencia jonhstonii

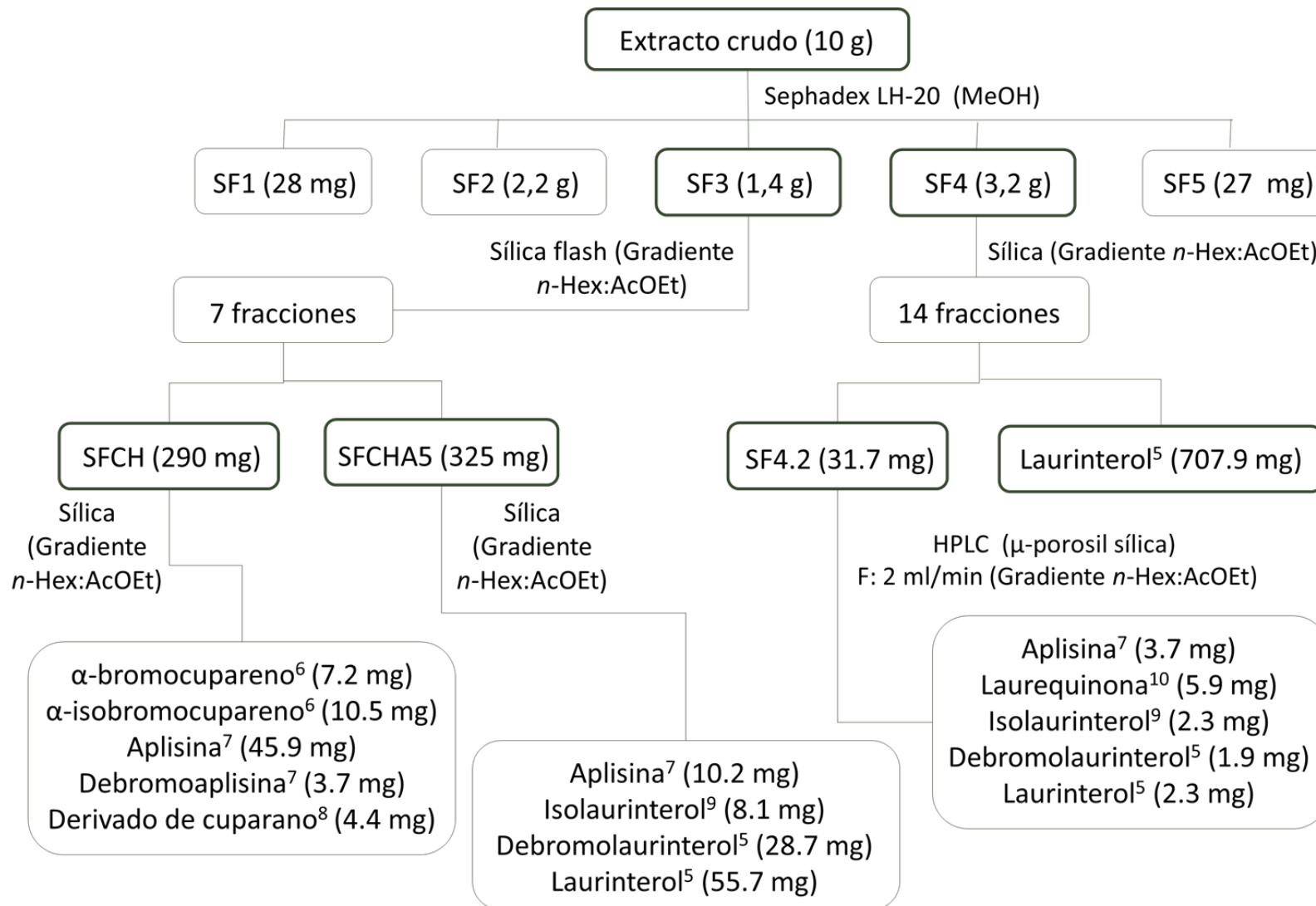


García-Davis *et al.*, 2018

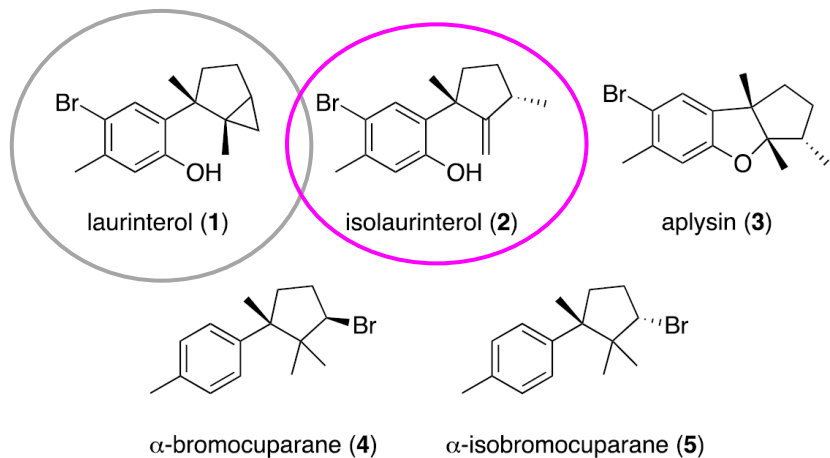
Laurencia johnstonii

1. La *Laurencia johnstonii* fue recogida en la costa del Golfo de California, México.
2. Los especímenes limpios y secos se extrajeron en etanol para obtener un extracto crudo que mostró una moderada actividad anti-*Acanthamoeba* con un valor IC50 de $125,14 \pm 4,5 \mu\text{g/mL}$.
3. El fraccionamiento del extracto etanólico por Sephadex LH-20, guiado por el bioensayo, nos condujo a una fracción activa (SF3).
4. Esta fracción se sometió a una nueva cromatografía en una columna de gel de sílice utilizando un gradiente de n-hexano a EtOAc para obtener siete subfracciones.
5. La más activa fue la SF3.1 (fracción n-hexano).
6. Tras una separación en una columna abierta de gel de sílice eluida con mezclas de n-hexano:EtOAc, la fracción SF3.1 dio alysin, y los estereoisómeros activos α -bromocuparano y α -sobromocuparano, que mostraron actividad contra *Acanthamoeba castellanii* Neff.
7. Además, el laurinterol, y el isolaurinterol fueron de la fracción inactiva SF3.2. Los datos de RMN, espectrometría de masas y rotación óptica de (1)-(5) se compararon con los publicados anteriormente en la literatura para confirmar sus estructuras.

Laurencia jonthstonii



Laurencia jonhstonii



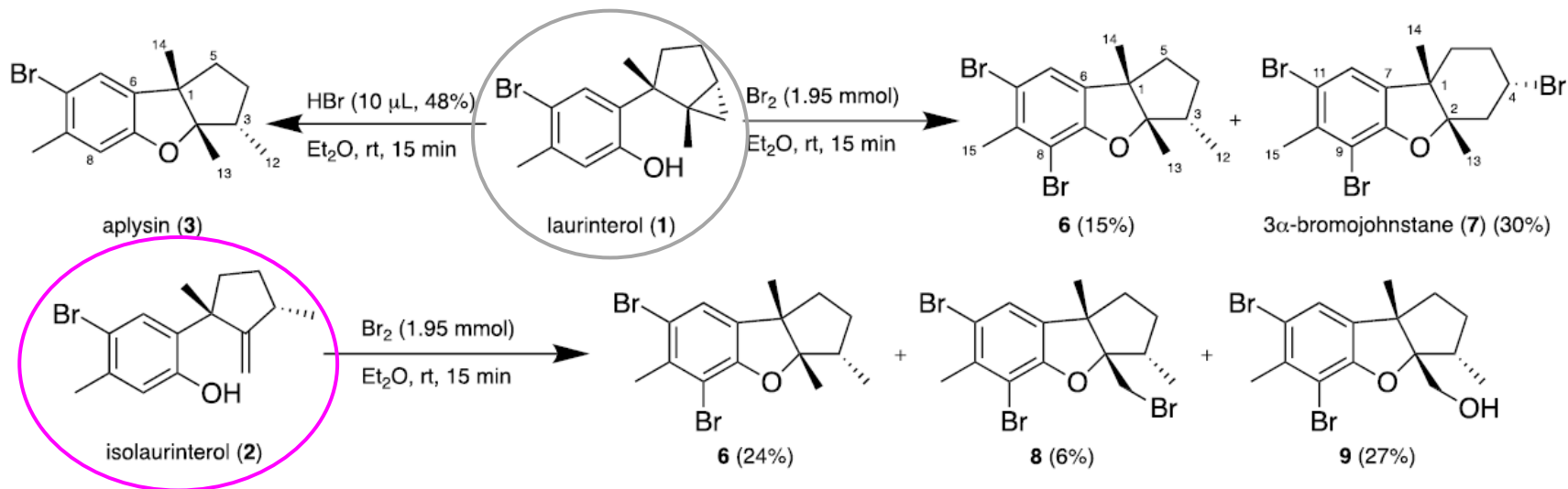
(6) 8-Bromoaplisina

(7) 3 α -Bromojohnstano

(6) 8-Bromoaplisina

(8) 8-8,10-Dibromoisoaplisina

(9) 8,10-Dibromoaplisinol



Laurencia janhstonii

Actividad en trofozoítos de *Acanthamoeba* y citotoxicidad frente a células de ratón

Compuesto	CI ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
Extracto crudo	125,14 ± 4,5	n/d
1 Laurinterol	> 100	23,65 ± 2,3
2 Isolaurinterol	> 100	7,25 ± 0,7
3 Aplisina	> 100	323,69 ± 12,0
4 α-bromocuparano	90,674 ± 1,529	33,04 ± 4,2
5 α-isobromocuparano	64,251 ± 3,492	85,34 ± 10,9
6 8-Bromoaplisina	24,559 ± 1,105	32,880 ± 3,125
7 3α -Bromojohnstano	18,804 ± 0,198	62,341 ± 2,589
8 8,10-Dibromoisoaplisina	22,818 ± 1,896	70,365 ± 3,245
9 8,10-Dibromoaplisinol	29,937 ± 2,918	74,931 ± 2,769
Clorhexidina*	1,526 ± 0,45	6,64 ± 0,35
Voriconazol*	0,33 ± 0,1	2,64 ± 0,27

