

Indice

		Pagina
	Título	i
	Dedicatoria	iii
	Agradecimientos	iv
	Indice	v
	Lista de figuras	x
	Lista de tablas	xi
	Lista de abreviaciones	xii
	Resumen	xvi
	Abstract	xviii
1	Introducción	1
1.1	Fundamento teórico	1
1.2	Hipótesis de trabajo	20
1.3	Objetivos generales	21
1.4	Objetivos específicos	21
2	Materiales y Métodos	23
2.1	Especies vegetales	23
2.1.1	<i>Prumnopitys andina</i>	23
2.1.2	<i>Podocarpus nubigena</i>	23
2.1.3	<i>Sphacele chamaedryodes</i>	23
2.2	Obtención de extractos	23
2.2.1	<i>Prumnopitys andina</i>	23
2.2.2	<i>Podocarpus nubigena</i>	24
2.2.3	<i>Sphacele chamaedryodes</i>	24
2.3	Aislamiento de Productos Naturales	24
2.3.1	<i>Prumnopitys andina</i>	24
2.3.1.1	Madera	24

2.3.1.2	Corteza	24
2.3.2	<i>Podocarpus nubigena</i>	25
2.3.2.1	Corteza	25
2.3.2.2	Madera	25
2.3.3	<i>Sphacele chamaedryodes</i>	25
2.3.3.1	Hojas	25
2.3.3.1.1	Extracto de éter de petróleo	25
	a.- Aislamiento mediante HSCCC	26
2.3.3.1.2	Extracto de acetato de etilo	27
2.4	Preparación de derivados semisintéticos a partir del diterpeno ferruginol	29
	8,11,13-abietatrieno	29
	12-metoxi-8,11,13-abietatrieno	29
	trifluorometanosulfonato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	30
	metanoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	30
	etanoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	31
	propanoato de 8,11,13(14)-abietatrien-12-ilo	31
	2-cloropropanoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	32
	propenoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	32
	benzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	33
	<i>o</i> -metilbenzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	33
	<i>p</i> -metilbenzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	34
	<i>p</i> -metoxibenzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	34
	<i>m</i> -nitrobenzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	35
	<i>p</i> -nitrobenzoato de 8,11,13-abietatrien-12-ilo	35
	12-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosiloxi)-abieta-8,11,13-trieno	36
	12-(β -D-glucopiranosiloxi)-abieta-8,11,13-trieno	36
	12-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-galactopiranosiloxi)-abieta-8,11,13-trieno	37

	12-(β -D-galactopiranosiloxi)-abieta-8,11,13-trieno	37
2.5	Biotransformación de ferruginol mediante hongos filamentosos	38
2.5.1	Microorganismos	38
2.5.2	Preparación del medio de cultivo	38
2.6	Solventes y Reactivos	39
2.7	Métodos Espectroscópicos y Espectrométricos	39
2.7.1	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	39
2.7.2	Espectroscopía Infrarroja	40
2.7.3	Espectrometría de masas	40
2.8	Constantes Físicas	40
2.8.1	Punto de Fusión	40
2.8.2	Rotación óptica	40
2.9	Lipofilicidad	40
2.10	Ensayos Biológicos	40
2.10.1	Modelo de úlcera inducido por HCl:EtOH	40
2.10.2	Úlcera inducida por HCl:EtOH previo uso de antagonistas	41
2.10.3	Toxicidad oral aguda	41
2.10.4	Úlcera inducida por etanol	42
2.10.5	Determinación de la secreción gástrica	42
2.10.6	Determinación de glutatión reducido	43
2.10.7	Determinación de mucus en la pared gástrica	43
2.10.8	Determinación de la síntesis de prostaglandinas (PGE ₂)	44
2.11	Ensayos Celulares	45
2.11.1	Cultivo de fibroblastos	45
2.11.2	Cultivo de células gástricas	45
2.11.3	Ensayo de citotoxicidad	45
2.12	Análisis estadístico	46

3	3.0 Resultados	47
3.1	<i>Prumnopitys andina</i>	47
3.1.1	Derivados de ferruginol	47
3.2	<i>Podocarpus nubigena</i>	52
3.3	Biotransformación del ferruginol	52
3.4	<i>Sphacele chamaedryodes</i>	60
3.4.1	Extracto de éter de petróleo	60
3.4.2	Extracto acetato de etilo	64
3.5	Actividad Biológica	68
3.5.1	Ferruginol y sus derivados	68
3.5.1.1	Ensayos <i>in vivo</i>	68
3.5.1.1.1	Úlcera inducida por HCl:EtOH en ratones	68
3.5.1.2	Ensayos <i>in vitro</i>	70
3.5.1.2.1	Citotoxicidad	70
3.5.1.3	Lipofilicidad	71
3.5.2	Mecanismo gastroprotector de ferruginol	72
3.5.2.1	Ensayos <i>in vivo</i>	72
3.5.2.1.1	Úlcera inducida por etanol	72
3.5.2.1.2	Determinación de la secreción gástrica	73
3.5.2.1.3	Determinación de glutatión reducido (GSH)	74
3.5.2.1.4	Determinación de mucus en la pared gástrica	74
3.5.2.1.5	Determinación del contenido de prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	75
3.5.2.1.6	Úlcera inducida por HCl:EtOH previo uso de antagonistas	76
3.5.2.2	Ensayo de toxicidad <i>in vivo</i>	77
3.5.2.2.1	Toxicidad oral aguda	77
3.5.3	Productos naturales de <i>Sphacele chamaedryodes</i>	78
3.5.3.1	Ensayos <i>in vivo</i>	78
3.5.3.1.1	Úlcera inducida por HCl:EtOH en ratones	78
3.5.3.2	Ensayos <i>in vitro</i>	80
3.5.3.2.1	Citotoxicidad	80

3.5.3.3	Lipofilicidad	80
4	Discusión	81
4.1	Bioactividad de ferruginol, sus derivados semisintéticos y totarol	82
4.2	Actividad gastroprotectora de los diterpenos obtenidos por semisíntesis y su relación estructura-actividad	84
4.3	Citotoxicidad de los derivados semisintéticos y totarol	87
4.4	Mecanismo gastroprotector del diterpeno ferruginol	88
4.4.1	Úlcera inducida por etanol	89
4.4.2	Determinación de secreción gástrica	89
4.4.3	Determinación de glutatión reducido	90
4.4.4	Determinación del contenido de prostaglandina E ₂	91
4.5	<i>Sphacele chamaedryodes</i>	93
4.5.1	Bioactividad de los compuestos aislados	93
4.5.2	Actividad gastroprotectora y su relación estructura-actividad	96
4.5.3	Citotoxicidad	98
5	Conclusiones	99
6	Aspectos originales de la Tesis y contribución al conocimiento científico	101
6.1	Propuestas de investigación como consecuencia de la Tesis	102
7	Referencias Bibliográficas	104
8	Anexos	129
8.1	Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos descritos en esta Tesis	129
8.2	Publicaciones derivadas de la Tesis	134
8.3	Trabajos presentados a congresos	134

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Principales aspectos de la regulación de la secreción de ácido gástrico.	3
Fig. 2 Cascada del ácido araquidónico.	9
Fig. 3 Función de GSH como antioxidante.	11
Fig. 4 Estructura química de los agonistas inversos del receptore H ₂ y de los inhibidores de la bomba de protones.	15
Fig. 5 Estructura química de agentes protectores de la mucosa gástrica.	16
Fig. 6 Estructura del dimetilalildifosfato (DMAPP) e isopentenildifosfato (IPP).	18
Fig. 7 Fraccionamiento de las hojas de <i>Sphacele chamaedryoides</i> .	28
Fig. 8 Producto de biotransformación de ferruginol por <i>Mortierella isabellina</i> .	39
Fig. 9 Estructura de ferruginol 1 , y sus derivados semisintéticos 2-19 .	53
Fig. 10 Estructura de los flavonoides 22 y 31 , diterpenos 23-29 y el sesquiterpeno 30 aislado de las partes aéreas de <i>Sphacele chamaedryodes</i> .	65
Fig. 11 Efecto de ferruginol (F) a 25 y 50 mg/kg, lansoprazol (L) a 30 mg/kg y 12 % Tween 80 (T) en el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol absoluto en ratas.	72
Fig. 12 Efecto de ferruginol (F) a 25 mg/kg, cimetidina (C) a 100 mg/kg y 12% Tween 80 (T) en los parámetros bioquímicos del jugo gástrico en el modelo de ligadura de píloro en ratas.	73
Fig. 13 Efecto de ferruginol (F) a 25 y 50 mg/kg, lansoprazol (L) a 30 mg/kg, 12% Tween 80 (T), normal (N) y sham (S) en el contenido de glutatión reducido en la parte glandular del estómago de ratas.	74
Fig. 14 Efecto de ferruginol (F) a 25 mg/kg, carbenoxolona sódica (C) a 200 mg/kg y 12 % Tween 80 (T) en el contenido de mucus en la pared gástrica en ratas.	75
Fig. 15 Efecto de ferruginol (F) a 25 y 50 mg/kg, indometacina (I) a 30 mg/kg, 12% Tween 80 (T) y normal (N) en el contenido de prostaglandina E ₂ en la mucosa gástrica de ratas.	75
Fig. 16 Efecto de ferruginol (F) a 25 mg/kg ó 12% Tween 80 (T) en lesiones gástricas inducidas por HCl:EtOH con A) Indometacina (I) B) <i>N</i> -etilmaleimida (NEM) C) N ⁶ -nitro- <i>L</i> -arginina metil ester (NAME) D) Rojo de rutenio (RR).	76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Fármacos usados en el tratamiento de la úlcera péptica.	15
Tabla 2 Terapia para erradicar la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> .	16
Tabla 3 Datos espectroscópicos de ¹ H RMN de los compuestos 1-9 .	54
Tabla 4 Datos espectroscópicos de ¹ H RMN de los compuestos 10-15 .	55
Tabla 5 Datos espectroscópicos de ¹ H RMN de los compuestos 16-19 y 21 .	56
Tabla 6 Datos espectroscópicos de ¹³ C RMN de los compuestos 1-9 .	57
Tabla 7 Datos espectroscópicos de ¹³ C RMN de los compuestos 10-15 .	58
Tabla 8 Datos espectroscópicos de ¹³ C RMN de los compuestos 16-19 y 21 .	59
Tabla 9 Datos espectroscópicos de ¹ H RMN de los terpenos 23-30 aislado de <i>Sphacele chamaedryodes</i> .	66
Tabla 10 Datos espectroscópicos de ¹³ C RMN de los terpenos 23-30 aislado de <i>Sphacele chamaedryodes</i> .	67
Tabla 11 Efecto de ferruginol (1) y lansoprazol (Lan) en el modelo de úlcera inducida por HCl:EtOH en ratones.	68
Tabla 12 Efecto gastroprotector de ferruginol (1), los derivados semisintéticos 2-3 , 6-19 , totarol 20 y lansoprazol a 20 mg/kg en lesiones gástricas inducidas por HCl:EtOH en ratones.	69
Tabla 13 Citotoxicidad de los compuestos 1-20 sobre fibroblastos y células AGS.	70
Tabla 14 Ensayo dosis-respuesta del carnosol (25) y efecto gastroprotector de los compuestos 23-29 a 5 mg/kg y lansoprazol (Lan) a 20 mg/Kg en el modelo de úlcera inducida por HCl:EtOH en ratones.	79
Tabla 15 Citotoxicidad de los compuestos 22-31 sobre fibroblastos y células AGS.	80

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AGS	Línea celular de adenocarcinoma gástrico humano
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
br s	Singulete ancho
CC	Cromatografía en columna
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
C₁₄H₁₉O₉Br	Glicosil donante
COSY	Espectroscopía de correlación
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
¹³C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
d	Doblete
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DHA	Ácido dehidroabiético
DHC	Deshidrocrotonina
DL₅₀	Dosis letal media
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dq	Doble cuarteto
ECL	Célula enterocromafín
ED₅₀	Dosis eficaz media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EI-MS	Espectrometría de masas con ionización electrónica

EP	Éter de petróleo
Et₂O	Éter etílico
EtOH	Etanol
eV	Electrón Voltio
Fr.	Fracción
FGFb	Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
Ham F12	Medio de cultivo de Ham modificado F-12
HETEs	Hidroxicieicosatetraenoicos
HPETEs	Hidroperoxieicosatetraenoicos
HGF	Factor de Crecimiento Hepático
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiple enlace
¹H RMN	Resonancia magnética nuclear de protones
HSCCC	Cromatografía de partición centrífuga de alta velocidad
Hz	Hertz
I	Indometacina
i.p.	Intraperitoneal
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
log P	Logaritmo del coeficiente de partición <i>n</i> -octanol/agua
m	Multiplete
M	Molar
MEM-E	Medio esencial mínimo de Eagle
Me₂CO	Acetona

MeOH	Metanol
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
MRC-5	Línea celular permanente derivada de fibroblastos de pulmón humano
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
N	Normal
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetasa
eNOS	Óxido Nítrico Sintetasa endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintetasa inducible
nNOS	Óxido Nítrico Sintetasa neuronal
NR	Rojo neutro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGs	Prostaglandinas
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
p.o.	Vía oral
Py	Piridina
q	Cuarteto
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Rojo de rutenio
s	Singulete

s.c.	Subcutáneo
SFB	Suero fetal bovino
SHs	sulfhídricos
t	Triplete
TGF-α	Factor de crecimiento transformante- α
TLC	Cromatografía en capa delgada
UBA	Universidad de Buenos Aires
UV	Ultra violeta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VR-1	Receptor vanilloide tipo 1
[α]_D²⁰	Rotación óptica
δ	Desplazamiento químico