

# INGENOLES AISLADOS DE LA ESPECIE *Euphorbia cotinifolia* INDUCEN APOPTOSIS EN CÉLULAS JURKAT

LILIANA BETANCUR-GALVIS<sup>1\*</sup>, JAVIER ROLDAN<sup>2</sup>, GLADIS MORALES<sup>3</sup>, JELVER SIERRA<sup>1</sup>,  
MAGDALENA BLANCO-MOLINA<sup>4</sup>, ANTONIO MACHO<sup>4</sup>, J. ALBERTO MARCO<sup>5</sup>

---

## ABSTRACT

From among ten species of the *Euphorbia* genus (family *Euphorbiaceae*), *E. cotinifolia* showed the highest antitumour activity *in vitro* and was thus chosen for activity-monitored fractionations and identification of its active principles. Isolation was carried out using bioassays that evaluated important cell functions related to the antitumour activity. These were a drop of the mitochondrial transmembrane potential  $\Delta\Psi_m$ ; production of reactive oxygen species (ROS); and the induction of apoptosis. A compound which showed an apoptotic effect was isolated from the plant. The compound was found to induced first the drop of  $\Delta\Psi_m$ ; then, as a second step, ROS were generated. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectral data, aided by heteronuclear 2D correlations (HMQC, HMBC) indicated that the compound was a diester of the tetracyclic diterpene ingenol. The very small amount isolated did not permit an unequivocal structure assignment but the compound is most likely 3-*O*-tigloyl-20-*O*-propionylingenol.

Key Words: *Euphorbia cotinifolia*; *Euphorbiaceae*; diterpenes; ingenol esters; antitumour activity; apoptosis; medicinal plants.

## RESUMEN

La especie *Euphorbia cotinifolia*, de la familia *Euphorbiaceae*, fue elegida de entre diez plantas del género *Euphorbia* para hacer un aislamiento bioguiado de sus principios activos, al ser la que mostró mayor actividad antitumoral *in vitro*. Este aislamiento se realizó utilizando bioensayos que evaluaron determinadas funciones celulares importantes, relacionadas con la actividad antitumoral. Dichas funciones fueron la caída del potencial

<sup>1</sup>Grupo de Inmunovirología-Biogénesis. CIM. Universidad de Antioquia. A. A1226. Medellín. Colombia.

<sup>2</sup>Departamento de Biología. Universidad de Antioquia.

<sup>3</sup>Departamento de Química. Grupo GIEM. Universidad de Antioquia.

<sup>4</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. E-14071 Córdoba. España.

<sup>5</sup>Departamento de Química Orgánica. Universidad de Valencia, E-46100 Burjassot, Valencia. España.

\* To whom correspondence should be addressed: (L.B.G) Tel.:574-5106059. Fax: 574-5106062.

E-mail: labeta@catios.udea.edu.co.

mitocondrial  $\Delta\Psi_m$ , la producción de especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS) y la inducción de apoptosis. Fue posible aislar de la planta un compuesto puro que mostró un efecto apoptótico, en el que primero se afectó la mitocondria con una fuerte caída del  $\Delta\Psi_m$  y luego se generaron ROS de forma secundaria. Del examen cuidadoso del espectro de  $^1\text{H}$ -y  $^{13}\text{C}$  RMN, con ayuda adicional de correlaciones bidimensionales heteronucleares (HMQC/HMBC), se pudo establecer que el compuesto era un diéster del alcohol diterpénico tetracíclico ingenol. Aunque la pequeña cantidad aislada no permitió una asignación estructural inequívoca, el compuesto es muy probablemente el 3-*O*-tigloil-20-*O*-propionilingenol.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han intensificado las investigaciones sobre la actividad biológica y los mecanismos bioquímicos subyacentes a la misma de diterpenos con esqueleto de tigliano, dafnano e ingenano aislados de especies de la familia *Euphorbiaceae*. Dichos compuestos son con frecuencia promotores de tumores (Evans & Taylor, 1983; Sorg, *et al.*, 1987) pero exhiben también en muchos casos, actividad antitumoral (Evans & Taylor, 1983; Itokawa, *et al.*, 1989). Las moléculas receptoras o dianas celulares identificadas hasta ahora para este tipo de estructuras químicas son principalmente enzimas de la familia proteína cinasa C (PKC) (Szallasi, *et al.*, 1994; Slosberg, *et al.*, 1999) y enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como guanidil ciclasa y calmodulina cinasa II (Orie, *et al.*, 1999), además de la NADH-oxidasa del sistema de transporte de electrones a nivel mitocondrial (Noack, *et al.*, 1980). Se ha comprobado que la activación de la PKC genera una desregulación proteolítica particularmente en algunas isoenzimas de PKC, enzimas que son degradadas también en los procesos de inducción de apoptosis a través de la caspasa3 (Basu, *et al.*, 2001).

La apoptosis es definida como una "muerte celular programada", y la mayoría de las alteraciones bioquímicas y morfológicas mostradas por las células que entran

en apoptosis están reguladas por la mitocondria (Green & Red, 1998). Se cree que estas alteraciones en la mitocondria implican tres mecanismos relacionados entre sí: 1) caída del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), con la consiguiente alteración de la cadena de transporte electrónico y, por lo tanto, de la fosforilación oxidativa. 2) liberación de proteínas activadoras de las caspasas celulares, entre ellas la caspasa3, clave en todos los procesos degenerativos (Green & Red; 1998; Hengartner, 2000). 3) alteración del potencial de oxidoreducción celular, como consecuencia del bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial (Green & Red, 1998).

En los últimos años los mecanismos de acción de algunos agentes antitumorales están siendo asociados con la capacidad de estos compuestos de inducir apoptosis, pero hasta el momento no se ha estudiado esta capacidad en principios activos aislados de especies de la familia *Euphorbiaceae*. Ello motiva a profundizar en el aislamiento bioguiado de metabolitos secundarios con dichas características en especies cuya información etnobotánica apunten hacia una posible actividad antitumoral. Es así como un estudio previo en la ciudad de Medellín-Colombia, comprendió la recolección y evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* de varias especies de *Euphorbiaceae*, de la mayoría de las cuales se ha descrito en medicina popular alguna propiedad farmacológica (cicatrizante, cáustico, antitumoral, irritante, antiviral) relacionada con

eventos de regulación de la proliferación celular. En ese estudio se evidenció la actividad citotóxica de la especie *Euphorbia cotinifolia* en líneas tumorales (Betancur-Galvis, *et al.*, 2002). A la vista de este hecho, se emprendió un estudio químico bioguiado de *E. cotinifolia* que, a partir de la evaluación de la inducción de apoptosis en células jurkat, ha conducido al aislamiento del diterpeno ingenol 3-O-tigloil-20-propionilingenol.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fase inicial del presente estudio sobre *E. cotinifolia*, se obtuvieron mediante separaciones cromatográficas diversas fracciones ricas en compuestos diterpenoides. Se evaluó a continuación la capacidad de aquéllas para inducir apoptosis en la línea celular jurkat analizando el porcentaje de células subdiploides mediante citometría de flujo (CF) (ver materiales y métodos). En el primer fraccionamiento cromatográfico se obtuvieron ocho fracciones, siendo las más activas para inducir apoptosis las fracciones F8, F3 y F2 (ver tabla 1). También se estudiaron simultáneamente mediante CF algunos estados bioquímicos que anteceden a la inducción de la apoptosis tales como la caída del potencial mitocondrial ( $\downarrow\Delta\Psi_m$ ) y la inducción de especies de oxígeno reactivo ( $\uparrow\text{ROS}$ ) (ver tabla 1). La fracción F8 provocó en las primeras 6 h de tratamiento una  $\downarrow\Delta\Psi_m$  en el 54.3% de las células y una  $\uparrow\text{ROS}$  en el 10.8%. Después de 24 h de tratamiento se observó un 9.1% de células apoptóticas determinadas por el grado de cromatinolisis presente en éstas. Según los resultados, el tratamiento con la fracción F8 produjo inicialmente una  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y luego la generación de  $\uparrow\text{ROS}$ , ruta de señalización de apoptosis conocida como ruta clásica (Castedo, *et al.*, 1996) que es característica de la mayoría de estímulos apoptóticos. En contraste, la fracción F3 generó en el 31.3% de las células  $\uparrow\text{ROS}$  y en el 16.3%  $\downarrow\Delta\Psi_m$ , y un 13.4% de

apoptosis; lo que significa que inicialmente hubo un  $\uparrow\text{ROS}$  y luego  $\downarrow\Delta\Psi_m$ . Esta ruta de inducción de apoptosis es característica de ciertos compuestos con estructura vanilloide (Macho, *et al.*, 1998). La fracción F2 fue directamente fraccionada a través de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), obteniéndose fracciones activas que indujeron apoptosis tanto por la ruta clásica ( $F_2F_4$ ) como por la ruta vanilloide ( $F_2F_3$ ) como se puede ver en la tabla 1. Las fracciones  $F_2F_5$  y  $F_2F_6$  indujeron una apoptosis muy potente y rápida que no permitió el análisis de la ruta de inducción.

Las fracciones aisladas de *E. cotinifolia* generaron principalmente dos rutas diferentes de señalización de muerte celular inducida. La figura 1 muestra los histogramas de citometría de flujo de las fracciones con actividad más relevante correspondiente a los resultados listados en la tabla 1. En la columna izquierda (figura 1), se muestra el grado de citotoxicidad generado tras 6 h de tratamiento con las fracciones, evaluado a través de la técnica del yoduro de propidio (PI) sin permeabilizar las células. La columna central corresponde a los histogramas bidimensionales para la determinación simultánea de  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y  $\uparrow\text{ROS}$  tras un tratamiento de 6h. Los estados bioquímicos que anteceden a la inducción de la apoptosis pueden clasificarse en cuatro cuadrantes para cada histograma. El cuadrante inferior derecho (cuadrante 4) muestra las células con parámetros bioquímicos estables  $\uparrow\Delta\Psi_m$  y  $\downarrow\text{ROS}$ , como se observa en el control celular, en el que el 89.9 % de las células se encuentra en dicho estado. El cuadrante inferior izquierdo (cuadrante 3) muestra células con  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y  $\downarrow\text{ROS}$ . El cuadrante superior derecho (cuadrante 2) corresponde a células con  $\uparrow\Delta\Psi_m$  y  $\uparrow\text{ROS}$ . Finalmente, el cuadrante superior izquierdo (cuadrante 1) muestra las células que poseen  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y  $\uparrow\text{ROS}$ , que son células preapoptóticas ya que éstas evolucionarán irreversiblemente hacia la siguiente fase, la fragmentación del ADN

Tabla 1. Determinación de los cambios en  $\Delta\Psi_m$  y ROS, Apoptosis y Citotoxicidad en Células Jurkat inducidos por las fracciones obtenidas de la especie vegetal *Euphorbia cotinifolia*

Fracción <sup>a</sup>	Células muertas <sup>b</sup>	Células vivas <sup>b</sup>		% Apoptosis <sup>c</sup>
		% $\Delta\Psi_m$	% $\uparrow$ ROS	
Control*	3.6	5.3	2.5	5.7
F2F1	8.3	8.6	5.0	—
F2F2	16.6	10.4	12.8	—
F2F3	41.1	36.1	52.4	21.0
F2F4	23.5	90.9	56.3	12.5
F2F5	76.7	51.5	54.8	51.0
F2F6	63.0	37.2	29.6	43.5
F3	11.6	16.3	31.3	13.
F8	9.3	54.3	10.8	9.1

<sup>a</sup> Concentración de las fracciones: 100 $\mu$ g/ml; <sup>b</sup> Evaluación realizada a las 6 h; <sup>c</sup> Evaluación realizada a las 24 h;

\*: control solvente utilizado para disolver las fracciones; —: datos no determinados

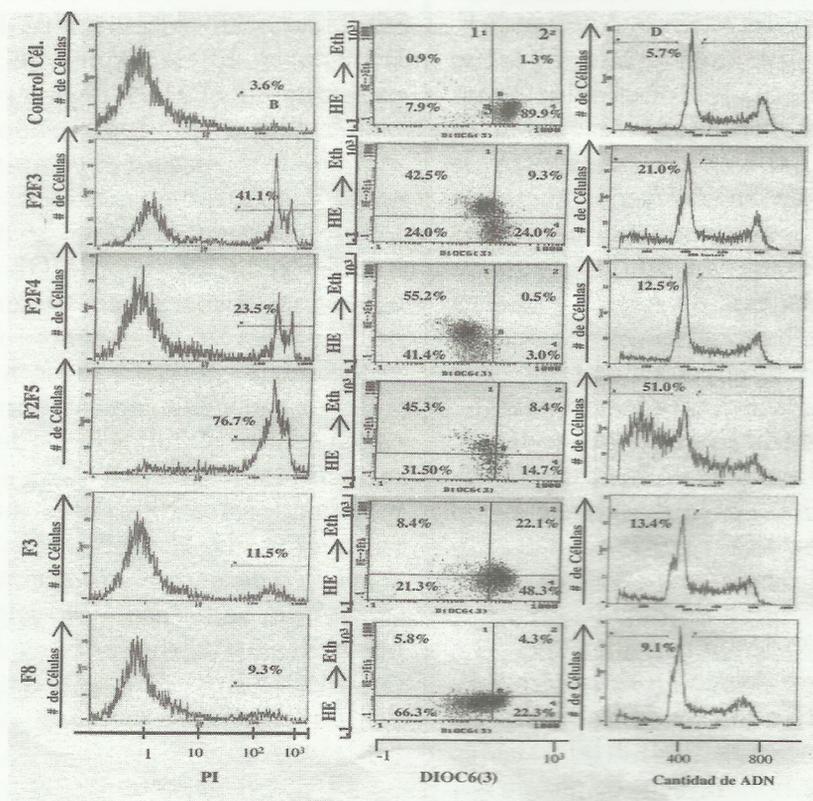


Figura 1. Apoptosis y citotoxicidad causada por las diferentes fracciones aisladas de *Euphorbia cotinifolia*. Columna izquierda (evaluación de la citotoxicidad): la región B muestra el porcentaje de células muertas del tratamiento por 6 h a 100  $\mu$ g/ml, evaluadas a través de la incorporación del PI en el DNA de las células permeables para este colorante vital (muertas). Columna central, tratamiento por 6 h a 100 mg/ml (histograma biparamétrico con dos sondas fluorescentes): cuadrante 1 superior izquierdo  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y  $\uparrow$ ROS; cuadrante 2 superior derecho  $\uparrow\Delta\Psi_m$  y  $\uparrow$ ROS; cuadrante 3 inferior izquierdo  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y  $\downarrow$ ROS; cuadrante 4 inferior derecho  $\uparrow\Delta\Psi_m$  y  $\downarrow$ ROS (células normales). Columna derecha (determinación de la apoptosis por el análisis del ciclo celular): la región D indica el porcentaje de cromatinólisis del ADN después de 24h de tratamiento.

(Zanzami *et al.*, 1998), rasgo característico de la apoptosis. Por último, la columna derecha muestra el porcentaje de células que son apoptóticas después de 24 h de tratamiento; en la región D se observa el ADN fragmentado.

El análisis de la figura 1 permite predecir los eventos bioquímicos que suceden en el tiempo durante el proceso de la inducción de la apoptosis. La fracción F<sub>2</sub>F<sub>3</sub> de mediana citotoxicidad (41.1%) presentó un 24% de células con  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y  $\downarrow$  ROS (cuadrante 3), que predominó sobre el 9.3% que presentaron  $\uparrow\Delta\Psi_m$  y  $\uparrow$ ROS (cuadrante 2). Estos datos obtenidos del estudio bidimensional llevan a pensar que el 42.5% de células preapoptóticas de la fracción F<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (cuadrante 1) han pasado primero por un estado de potencial mitocondrial bajo, dándose lugar como consecuencia a la disrupción de la cadena de transporte de electrones y a la alteración del potencial de oxido-reducción. Esto causa que haya a las 24 h un 21% de células apoptóticas (aunque una fracción mínima de células hayan podido seguir la ruta vanilloide, debido a la mezcla compleja de compuestos que presenta el extracto, presentando posiblemente mecanismos distintos de inducción de la apoptosis). La ruta de inducción clásica es mucho más clara en la fracción F<sub>2</sub>F<sub>4</sub> (el flujo de puntos del correspondiente histograma van del cuadrante 3 al 1), donde el 55.2% de las células en estado preapoptótico han sufrido inicialmente  $\downarrow\Delta\Psi_m$ . La fracción F<sub>8</sub> al igual que la fracción F<sub>2</sub>F<sub>4</sub> indujo la apoptosis por la vía clásica. La pérdida del potencial mitocondrial causado por las fracciones F<sub>2</sub>F<sub>3</sub>, F<sub>2</sub>F<sub>4</sub> y F<sub>8</sub> podría ser la consecuencia de la activación y desregulación de algunas isoformas de PKC. Esto ha sido demostrado por Denning y colaboradores para la activación de PKCdelta por luz ultravioleta, que induce apoptosis a través de la caída del potencial mitocondrial (Denning *et al.*, 2002).

La fracción F<sub>2</sub>F<sub>5</sub> mostró el porcentaje más alto de citotoxicidad debido principal-

mente a necrosis (datos no mostrados). La inducción de la apoptosis vía vanilloide fue mostrada parcialmente por la fracción F<sub>3</sub>, aunque presentó un porcentaje similar de células en los estados:  $\downarrow\Delta\Psi_m / \downarrow$ ROS y  $\uparrow\Delta\Psi_m / \uparrow$ ROS; la distribución de los puntos en el histograma mostró una tendencia hacia la generación inicial de ROS. Uno de los posibles mecanismos que explica la generación de ROS por la fracción F<sub>3</sub> y su consecuente inducción de la apoptosis, podría ser el planteada por múltiples autores para la resiniferatoxina aislada de la especie *Euphorbia resinifera* (Morré *et al.*, 1995; Macho *et al.*, 1999). Macho y colaboradores proponen que la generación de ROS puede darse por la inhibición del sistema NADH oxidasa del transporte de electrones de la membrana plasmática (PMOR), interferencia que podría causar una redirección del flujo normal de electrones en el complejo, generando como consecuencia un exceso de ROS. El ambiente pro-oxidativo generado por la inhibición del sistema PMOR puede inducir oxidación de los grupos tioles en los poros de transición de permeabilidad de la mitocondria, permitiéndose así la apertura y, como consecuencia, la libre distribución de los solutos a ambos lados de la membrana mitocondrial interna. Con el objetivo de relacionar estos diferentes mecanismos de inducción de la apoptosis con un tipo específico de metabolito secundario de la *E. cotinifolia*, se procedió al aislamiento de los principios activos guiado por los bioensayos de  $\downarrow\Psi_{\Delta m}$  y  $\uparrow$ ROS de las fracciones F<sub>2</sub>F<sub>3</sub> y F<sub>3</sub>, de las cuales se contaba con suficiente cantidad.

El nuevo fraccionamiento cromatográfico por HPLC de F<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (ver materiales y métodos) dio varias fracciones, las cuales (según el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón) contenían en su mayoría mezclas de diterpenos de tipo ingenano (datos no mostrados). Las fracciones más activas (ver tabla 2) presentaron las siguientes características químicas: la fracción F<sub>2</sub>F<sub>3</sub>F<sub>6</sub> presentaba una

mezcla de dos ingenoles uno de ellos presente en la fracción  $F_2F_3F_7$ ; la fracción  $F_2F_3F_7$  contenía un compuesto puro al que denominamos **compuesto I**; la fracción  $F_2F_3F_{10}$  presentaba una mezcla de dos ésteres de ingenol y trazas de un tercero. Finalmente, la fracción  $F_3F_4F_7F_2F_2$ , obtenida de la fracción  $F_3$  a través de cuatro separaciones cromatograficas por HPLC, proporcionó el **compuesto I** con trazas de un segundo ingenol.

Tabla 2. Determinación de los Cambios en  $\Delta\Psi_m$  y ROS en Células Jurkat inducidos por la Mezcla de Ingenoles Obtenidas de la Especie Vegetal *Euphorbia cotinifolia*

Fracción	Células Vivas <sup>a</sup>		
	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	% $\downarrow\Delta\Psi_m$	% $\uparrow\text{ROS}$
Control (DMSO)*	5	0.9	5.1
F2F3F6	5	11.7	5.9
	25	38.2	11.5
	62.5	43.8	4.8
F2F3F7	25	9.1	2.6
	62.5	73.0	39.2
F2F3F10	5	10.7	8.4
	25	28.7	21.0
F3F4F7F2F2	25	6.9	3.8
	62.5	28.0	90.8

<sup>a</sup> Evaluación realizada a las 6 h; \*: control solvente utilizado para disolver las fracciones.

En la tabla 2 se muestra los cambios en  $\Delta\Psi_m$  y ROS de las células jurkat cuando fueron tratadas durante 6 h con las diferentes fracciones o mezclas de ingenoles obtenidos por HPLC. Para cada fracción se evaluaron varias concentraciones, con el fin de observar si se presentaba algún efecto dependiente de concentración. En la mezcla de ingenoles  $F_2F_3F_6$  se observó claramente la capacidad de estos compuestos para inducir una caída de potencial mitocondrial dependiente de la concentración; el porcentaje de células con  $\uparrow\text{ROS}$  fue constante para esta fracción, lo que nos indica que la  $\downarrow\Delta\Psi_m$  no generó inmediatamente  $\uparrow\text{ROS}$ . En contraste, el compuesto puro correspon-

diente a la fracción  $F_2F_3F_7$  generó un alto porcentaje de células con  $\downarrow\Delta\Psi_m$  (73%) a la concentración de  $62.5 \mu\text{g/ml}$ , generándose inmediatamente especies de oxígeno reactivo, lo que indica que hubo una alteración fuerte de la cadena de transporte de electrones. La fracción  $F_3F_4F_7F_2F_2$ , constituida principalmente por el compuesto I y alguna impureza de un segundo ingenol, presentó un mecanismo de acción distinto a la fracción  $F_2F_3F_7$ , ya que inducía abruptamente un aumento de ROS en el 90.8% de las células a una concentración de  $62.5 \mu\text{g/ml}$ . Con el objeto de correlacionar estos cambios bioquímicos con las vías de inducción de la apoptosis, se procedió a evaluar dichos ingenoles a las 24 y 48 horas y a estudiar además el ciclo celular.

Como se observa en la tabla 3, la fracción F2F3F6 indujo apoptosis a las 24 h, pero el efecto fue mas pronunciado a las 48 h, tiempo en el cual se observó un efecto dosis dependiente a bajas concentraciones. La fracción generó también una parada en la fase  $G_0/G_1$  cuando el tratamiento fue por 48h a una concentración de  $5 \mu\text{g/ml}$ ; este efecto fue igualmente observado cuando se redujo el tiempo de exposición y se aumentó la concentración. El compuesto puro F2F3F7 también indujo apoptosis de una manera dosis dependiente como se puede ver en la tabla 3; el efecto fue tan agudo que no se pudo observar una detención del ciclo celular. La fracción F3F4F7F2F2 indujo una potente apoptosis a las 24 h, este efecto no permitió observar una detención del ciclo en las concentraciones evaluadas. En general los ingenoles aislados de la especie *E. conitinifolia* mostraron detención del ciclo celular en la fase  $G_0/G_1$ ; aunque para algunos compuestos no fue posible evidenciar este fenómeno ya que la apoptosis se indujo antes de las 24 h.

Para aclarar las vías de inducción de la apoptosis de los compuestos de las fracciones  $F_2F_3F_7$  y  $F_3F_4F_7F_2F_2$ , se analizaron los correspondientes histogramas bidimensionales de citometría de flujo. Como se obser-

Tabla 3. Determinación de la apoptosis por el análisis del ciclo celular en Células Jurkat inducidos por la mezcla de ingenoles obtenidos de la especie vegetal *Euphorbia cotinifolia*

Fracción	[ $\mu\text{g/ml}$ ]	Tiempo Horas	% apoptosis	%G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% S	%G <sub>2</sub> /M
Control			4.0	59.4	25.6	9.9
F2F3F6	5	48	32.2	57.8	5.0	4.9
	25	48	78.1	12.9	8.3	1.0
	62.5	24	26.5	58.7	9.6	5.6
F2F3F7	25	24	35.1	39.7	16.2	9.1
	62.5	24	60.2	24.9	12.2	3.0
F2F3F10	5	48	26.3	61.6	6.7	5.4
	25	48	64.1	24.2	9.4	2.5
F3F4F7F2F2	25	24	54.4	34.6	8.3	3.2
	62.5	24	76.6	14.3	7.3	1.9

va en la figura 2, los dos compuestos mostraron diferentes rutas de inducción de la apoptosis. La fracción F<sub>2</sub>F<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, que contenía el **compuesto puro I**, mostró una dinámica de los acontecimientos que preceden a la apoptosis a través, principalmente, de dos estados bioquímicos relevantes: el 61.4% de las células tenían  $\downarrow\Delta\Psi_m$  y  $\downarrow$ ROS y el 25.9% estaban en estado preapoptótico, lo que indica que la vía para la inducción de la apoptosis fue la ruta clásica en la que inicialmente se produce una caída del potencial mitocondrial y luego la generación de ROS. La fracción F<sub>3</sub>F<sub>4</sub>F<sub>7</sub>F<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, que contenía principalmente el **compuesto I** y trazas de un segundo ingenol no identificado, presentó una dinámica completamente diferente, en la que los dos estados bioquímicos relevantes para el estudio de la cinética de los eventos preapoptóticos indicaron que el 61.2% de las células preapoptóticas provenían de un estado bioquímico en el que se presentaba inicialmente una alta proporción de especies de oxígeno reactivo. Esta aseveración puede ser evidenciada a través del estudio de la distribución de puntos del histograma de la figura 2, en el que éstos se concentraron principalmente en los cuadrantes 2 y 1. Ello nos lleva a concluir que la dinámica del evento apoptótico se inició con un estado bioquímico representado en el cuadrante 2, seguido del paso hacia el estado 1. Este fe-

nómeno se da de una manera abrupta ya que, como se puede ver en la figura 2 (parte derecha), el porcentaje de la apoptosis es mucho mayor para la mezcla de ingenoles presentes en la fracción F<sub>3</sub>F<sub>4</sub>F<sub>7</sub>F<sub>2</sub>F<sub>2</sub> que para el compuesto F<sub>2</sub>F<sub>3</sub>F<sub>7</sub>. Los cambios bioquímicos inducidos por la fracción F<sub>3</sub>F<sub>4</sub>F<sub>7</sub>F<sub>2</sub>F<sub>2</sub> son mucho más rápidos en inducir la apoptosis.

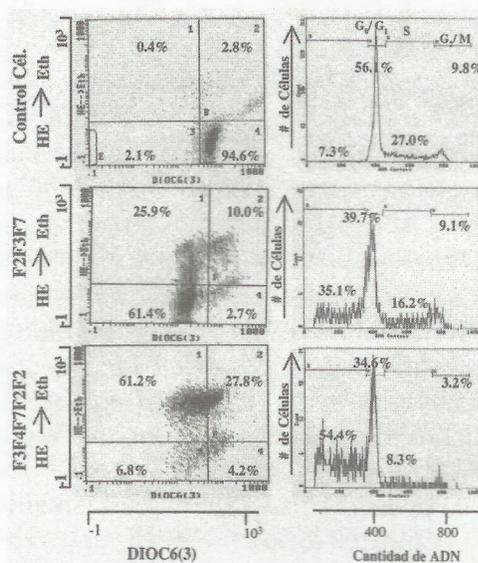


Figura 2. Apoptosis causada por las diferentes fracciones aisladas de *Euphorbia cotinifolia*. Columna izquierda, tratamiento por 6 h a 62.5  $\mu\text{g/ml}$  (histograma biparamétrico con dos sondas fluorescentes). Columna derecha (determinación de la apoptosis por el análisis del ciclo celular): la región D indica el porcentaje de cromatinolisis del ADN después de 24 h de tratamiento a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

Tabla 4. Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto I ( $\text{CDCl}_3$ , TMS como referencia interna)<sup>a</sup>

$\delta\text{H}$		$\delta\text{C}$	
1	6.02 br d(1.4) <sup>b</sup>	1	132.0
3	5.52 s	2	136.0
4-OH	3.45	3	83.0
5	3.87 s	4	84.9
5-OH	3.65 br s	5	74.9
7	6.10 d(4.4)	6	136.0
8	4.08 dd(11.5; 4.4)	7	129.3
11	2.48 m	8	43.7
12 $\alpha$	1.80 m*	9	§
12 $\beta$	2.24 ddd(16;7; 2.7)	10	72.0
13	0.69 ddd	11	38.7
14	0.96 m*	12	31.3
16	1.04 s	13	23.5
17	1.08 s	14	23.2
18	0.98 d(7)	15	24.1
19	1.78 d(1)	16	28.7
20	4.76 d(12.5)	18	17.5
OProp	1.12 t (7.5) 2.32 q (7.5)		§ / 27.7 / 9.3
OTigl	6.90 qq (7; 1.5) 1.86 d (1.5), 1.84 dq (7; 1.5)		168.8 / 138.7 / 128.2 / 14.7 / 12.4

<sup>a</sup>Los desplazamientos químicos fueron determinados a 400 ( $^1\text{H}$ ) y 100 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz \* Señales sobrepuestas. § Señal muy débil, no distinguible del ruido de fondo. <sup>b</sup> $\delta$  en ppm., J (en paréntesis), en Hz.

## Elucidación Estructural

El **compuesto I**, aislado de *Euphorbia cotinifolia*, fue identificado como el diéster diterpénico tetracíclico 3-*O*-tigloil-20-*O*-propionilingenol (figura 3) a partir de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN (tabla 4) y del estudio de las correlaciones bidimensionales heteronucleares (HMQC/HMBC).

En la tabla 4 se puede observar las siguientes características estructurales del 3-*O*-tigloil-20-*O*-propionilingenol: a) una señal doble a  $\delta = 6.10$  ( $J = 4.4$  Hz.) asignada al protón vinílico H-7 b) señal doble a  $\delta = 6.02$  ( $J = 1.4$  Hz) para el protón vinílico H-1 c) señal simple a  $\delta = 5.52$  para el protón H-3, base del tiglato d) señal doble de doble ancha a  $\delta = 4.08$  ( $J = 11.5$  y  $4.4$  Hz.) para el protón H-8 e) señales múltiples a  $\delta = 2.48$ ,  $\delta = 2.24$  y  $\delta = 1.80$  para los protones H-11 y H-12 f) una señal doble a  $\delta = 1.78$  ( $J = 1.0$  Hz) para los protones H-19 g) dos señales

múltiples a campo alto acopladas entre si a  $\delta = 0.69$  y  $\delta = 0.96$  asignadas a los protones H-13 y H-14, en un anillo de ciclopropano. h) dos señales simples a  $\delta = 1.08$  y  $\delta = 1.04$  correspondientes a dos metilos geminales en el anillo de ciclopropano. La ausencia de una señal simple para el metilo C-20 y la aparición en su lugar, de dos dobletes acoplados a  $\delta = 4.76$  y  $\delta = 4.50$  ( $J = 12.5$  Hz.) indican que el carbono C-20 esta oxigenado con un grupo éster. Dos señales simples en  $\delta = 3.45$  y  $\delta = 3.65$  las cuales desaparecen al adicionar  $\text{D}_2\text{O}$ , corresponden a los protones de los grupos hidroxilo en C-4 y C-5. El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muestra la presencia de dos grupos éster que fueron identificados como un propionato y un tiglato. La presencia del primero se dedujo de las señales características a  $\delta = 2.32$  (2H, q,  $J = 7.5$  Hz) y  $\delta = 1.12$  (3H, t,  $J = 7.5$  Hz). La del segundo, por las señales a  $\delta = 6.90$  (1H, qq,  $J = 7.0$  y  $1.5$  Hz.),  $\delta = 1.86$  (3H, d,  $J = 1.5$  Hz.) y

$\delta = 1.84$  (3H dq J = 7.0 y 1.5 Hz). Todas las asignaciones anteriores fueron confirmadas por experimentos de desacoplamiento de spin. Las correlaciones bidimensionales HMQC a un enlace confirmaron las asignaciones para H-1, H-7, H-8, H-13, H-14 y los metilos 16, 17, 18 y 19. La posición relativa de los ésteres propionato y tiglato se hizo en base a las correlaciones bidimensionales HMBC a dos y tres enlaces. La existencia de una correlación entre la señal a  $\delta = 5.52$  (H-3) y la del carbonilo del tiglato a  $\delta = 168.8$  estableció la posición del tiglato en el carbono 3. Por consiguiente, el propionato se encuentra unido al carbono 20.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Generales

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ -RMN y de  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron obtenidos utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y TMS como referencia interna en un espectrómetro Varian Unity 400. Para la cromatografía en columna se utilizó silica gel 60 (Merk 0.06-0.200 mm). Las separaciones por HPLC se llevaron a cabo en un equipo Konik KNK-500-IB, utilizando columnas de fase reversa RP-18 (Merck LiChroCART 250-10 de dimensiones 250x8mm).

### Material Vegetal

La especie *E. cotinifolia* fue recolectada en el mes de Octubre de 1998 en el municipio de Girardota del departamento de Antioquia-Colombia a una altitud 360 m. El espécimen fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia con el número HUA 115472.

### Extracción y aislamiento

A partir de 2 kilos del material fresco de las partes aéreas de la especie, se procedió a la primera extracción con una mezcla 9:1 de metanol/agua. Se eliminó la mayor parte del metanol por evaporación a presión reducida

y luego se llevó a cabo una partición por extracción de la fase acuosa con acetato de etilo. En la fase orgánica se concentraron todos los compuestos de interés. Finalmente, se llevó a sequedad la fase orgánica por rotaevaporación a presión reducida. Las ceras se eliminaron disolviendo el material seco en metanol caliente y dejando luego enfriar, primero a temperatura ambiente y a continuación doce horas a una temperatura de  $3^\circ\text{C}$ . Tras este periodo de sedimentación, se filtró la disolución para separar el disolvente del precipitado blanco, compuesto fundamentalmente por ceras. El líquido resultante se concentró en vacío, obteniéndose un peso de 15.24 g.

Para el fraccionamiento inicial, se empleó una columna de dimensiones 70 x 90 mm; y como eluyentes mezclas hexano-acetato de etilo en gradientes que fueron desde una proporción 3:1 hasta 1:1. Las fracciones obtenidas (desde  $F_1$  a  $F_8$ ), pasaron a una segunda separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eluyente empleado inicialmente fue una mezcla metanol: agua en gradientes desde 95:5 hasta 7:3. Las fracciones fueron purificadas a través de separaciones sucesivas por HPLC utilizando finalmente columnas analíticas en fase reversa RP-18 con mezclas acetonitrilo: agua en gradientes desde 9:1 hasta 65:35. El avance de las separaciones se siguió por análisis de las fracciones intermedias mediante RMN.

### Determinación de la Apoptosis y Detención del Ciclo Celular

Para esta determinación se utilizaron platos de cultivos de 24 pozos, con una concentración celular de  $5 \times 10^5$  de células jurkat/ml y evaluando máximo tres concentraciones por fracción cromatográfica. El grado de la inducción de apoptosis y el análisis del ciclo celular se determinó a las 24 ó 48 h, analizando el porcentaje de células subdiploides (que han sufrido cromatinolisis) mediante citometría de flujo. Para ello,

las células fueron permeabilizadas con etanol al 70% durante 24 h a 4°C, lavadas tres veces con PBS al 0.4% de glucosa e incubadas a temperatura ambiente con 20 mg/ml de yoduro de propidio (PI) y 50 U/ml de RNAasa en PBS durante un mínimo de una hora en ligera agitación (Nicolletti *et al.*, 1991). La citotoxicidad (necrosis + apoptosis) fue evaluada a las 6 h de incubación con las fracciones y determinada también por citometría de flujo con PI como se describió anteriormente, exceptuando la etapa de permeabilización.

### Estudio del Potencial Transmembrana de la Mitocondria y de la Generación de Especies Reactivas del Oxígeno

Se utilizaron platos de cultivos de 24 pozos, con una concentración celular de  $5 \times 10^5$  de células Jurkat/ml y evaluando máximo tres concentraciones por fracción cromatográfica a un tiempo de incubación de 6 h. El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) fue medido mediante una sonda fluorescente catiónica (DiOC<sub>6</sub>(3)), que se acumula en la mitocondria en función de su  $\Delta\Psi_m$ . Simultáneamente se midió la generación de especies

reactivas del oxígeno (ROS) mediante el uso de otro fluorocromo, el dihidroetidio (HE), que, tras ser oxidado por ROS, se transforma en el compuesto fluorescente rojo Etidio, analizable por citometría. Para realizar estas mediciones, se incubaron las células a estudiar ( $10^5$  cel/ml) durante 20 min en PBS conteniendo 20 nM DiOC<sub>6</sub>(3) y 2  $\mu$ M HE a 37°C. Inmediatamente tras la incubación, se analizaron estos parámetros por citometría de flujo. El estudio de las células en preapoptosis (antes de la fragmentación del ADN) se realizó mediante los mismos métodos determinando las células que presentaron a la vez  $\Delta\Psi_m$  bajo y ROS alto (Zamzami *et al.*, 1995).

Todas las medidas citofluorimétricas se realizaron en un EPICS XL de Coulter, equipado con tres fotomultiplicadores.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de colaboración ha sido realizado bajo los auspicios del Programa CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), subprograma X.

### REFERENCIAS

- Basu, A.; Woolard, M.D.; Johnson, C.L. Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2001, 8, 899-908.
- Betancur-Galvis, L.A.; Forero, J.E.; Morales, G.; Roldan, F.J. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the genus *Euphorbia*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2002, 97, 541-546.
- Castedo, M.; Hirsch, T.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Marchetti, P.; Macho, A.; Kroemer, G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J. Immunol* 1996, 157, 512-521.
- Denning MF, Wang Y, Tibudan S, Alkan S, Nickoloff BJ, Qin JZ. Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ* 2000.9(1):40-52
- Evans, F.J.; Taylor, S.E. Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumor diterpene of the plants families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 1983, 44, 1-99.

- Green, D.R.; Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **1998**, *281*, 1309-1316.
- Itokawa, H.; Ichihara, Y.; Watanabe, K.; Takeya, K. An Antitumor Principle from *Euphorbia lathyris*. *Planta Médica* **1989**, *55*, 271-272.
- Kroemer, G.; B. Dallaporta, Rescherigon, M.. The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Ann. Rev. Physiol.* **1998**, *60*, 619.
- Morré, D.J.; Chueh, P.J.; Morré, D.M. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1831-1835.
- Macho, A.; Lucena, C.; Calzado, M.A.; Blanco, M.; Donnay, I.; Appendino, G.; Muñoz, E. Phorboid 20-homovanillates induce apoptosis through a VR1-independent mechanism. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 483-492.
- Noack, E.A.; Grea, A.E.G.; Falsone, G. Inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by 4-deoxyphorbol triester, a poisonous constituent of the latex sap of *Euphorbia biglandulosa* Desf. *Toxicon*. **1980**, *18*, 165-167.
- Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M.C.; Grignani, F.; Riccardi, C. A rapid simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* **1991**, *139*, 271-280.
- Orie, N.N.; Zidek, W.; Tepel, M. Tyrosine and calcium/calmodulin kinase are common signaling components in the generation of reactive oxygen species in human lymphocytes. *life Sci* **1999**, *65*, 2135-2142.
- Slosberg, E.D.; Klein, M.G.; Yao, Y.; Han, E.K.; Schieren, I.; Weinstein, I.B. The alpha isoform of protein kinase Ca mediates phorbol ester-induced growth inhibition and p21cip1 induction in HC11 mammary epithelial cells. *Oncogene* **1999**, *18*, 6588-6666.
- Sodeoka, M.; Uotsu, K.; Shibasaki, M. Photoaffinity labeling of PKC with a phorbol derivative: importance of the 13-acyl group in phorbol ester-PKC interaction. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 795-798.
- Sorg, B.; Schmidt, R.; Hecker, E. Structure/activity relationships of polyfunctional diterpenes of the ingenane type. I. Tumor-promoting activity of homologous, aliphatic 3-esters of ingenol and of delta 7,8-isoingenol-3-tetradecanoate. *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 1-4.
- Szallasi, Z.; Smith, C.B.; Blumberg, P.M. Dissociation of Phorbol Esters Leads to Immediate Redistribution to the Cytosol of Protein Kinases Ca and Cd in Mouse Keratinocytes. *The Journal Biological Chemistry* **1994**, *269*, 27159-27162.
- Zamzami, N.; Marchetti, P.; Castedo, M.; Decaudin, D.; Macho, A.; Hirsch, T.; Susin, S.A.; Petit, P.X.; Mignotte, B.; Kroemer, G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 367-37

Revista

---

# Latinoamericana de Química



ISSN 0370-5943

**VOL. 30/2**

---

REVISTA  
LATINOAMERICANA DE QUÍMICA

**Fundadores**

Dr. Xorge A. Domínguez T<sup>†</sup>  
Dr. Tirso Ríos C.  
Dr. Jesús Romo Armería<sup>†</sup>  
Dr. Alfonso Romo de Vivar R.

**Consejo Editorial Presidentes:**

Dr. Nikolaus H. Fischer, Dpt. Chemistry, Louisiana State University  
Dr. Otto R. Gottlieb, Instituto de Química, Univ. de São Paulo.  
Dr. Pedro Joseph-Nathan, CINVESTAV, I.P.N.  
Dra. Rachel Mata E., Facultad de Química, UNAM  
Dr. Leovigildo Quijano, Instituto de Química, UNAM  
Dr. Eloy Rodríguez, Cornell University, Ithaca, N.Y.

**Comité Editorial**

**Editor Ejecutivo:** Dr. José S. Calderón P., Instituto de Química, UNAM

**Editor Asistente:** Dr. Baldomero Esquivel R., Instituto de Química, UNAM

---

**Editores Regionales: 2002.**

Dra. M. Fátima da Silva: Depto. de Química, U.F. de São Carlos, CP 676-13560-970, São Carlos-SP., Brasil.  
Dr. Antonio González G.†: Univ. de La Laguna, Instituto de Química de Prod. Nat. CSIC, Tenerife, España.  
Dr. Mahabir Gupta: Fac. de Farmacia, Univ. de Panamá, AP. 10767 E. Univ. Cd. de Panamá, Panamá.  
Dr. G. C. Lalor: University of West Indies, Chem. Dept., Kingston 7, Jamaica.  
Dr. Tom J. Mabry: Dept. of Botany, University of Texas, Austin, TX 78713, USA.  
Dra. M. C. Matulewicz: Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.  
Dr. Ricardo Muñoz: Escuela Politécnica Nacional, Depto. de Química Orgánica, Quito, Ecuador.  
Dr. Tatsuhiro Nakano: I.V.I.C., Sección de Química, AP 1827, Caracas, Venezuela.  
Dr. Enrique Pandolfi: Fac. de Química, Av. General Flores 2124, Casilla 1157, Montevideo, Uruguay.  
Dr. Cosimo Pizza: Dipto. di Chimica delle Sostanze Naturali, Univ. degli Studi di Salerno, Salerno, Italy.  
Dr. Ramón Pomés H.: Centro Nacional de Investigaciones Científicas, AP 6880, Cd. de La Habana, Cuba.  
Dra. Aura M. Puentes: Depto. de Química, Univ. Nacional, Bogotá, Colombia.  
Dr. Mario J. Silva O.: Fac. Cs. Nat. y Oc. Casilla 2407, AP 10, Univ. de Concepción, Concepción, Chile.  
Dr. René Torres Gaona: Univ. de Santiago de Chile, Fac. de Biología y Química, Santiago de Chile, Chile.  
Dr. G.H. Neil Towers: Dept. of Botany, Univ. of British Columbia, Vancouver B.C. V6T 1Z4, Canada.

---

Todas las contribuciones deben ser enviadas al Editor regional respectivo o al Comité Editorial en México. Se solicita a los autores que primero consulten las "Instrucciones a los autores", publicados en el Volumen 27 No. 1 o solicitar copias a: [uscaldel@correo.unam.mx](mailto:uscaldel@correo.unam.mx) y las "orientaciones y ámbitos" de la Revista (ver tapa posterior).

Suscripciones: La suscripción anual 2002 es gratuita. Se publica cuatrimestralmente (abril, agosto y diciembre, 1 volumen). Para toda América Latina, Canadá, Estados Unidos, Europa y resto del mundo. Para solicitarla dirigirse a Laboratorios Mixim, S.A. de C.V., Calle Jardín Sur # 6. Naucalpan de Juárez, Estado de México, C.P. 53000, Tel. (52) 5576-5800, Fax. (52) 5359-4512, e-mail [labmixim@prodigy.net.mx](mailto:labmixim@prodigy.net.mx)

REVISTA LATINOAMERICANA DE QUÍMICA. Es una revista editada cuatrimestralmente por Laboratorios Mixim S.A. de C.V., Calle Jardín Sur # 6. Naucalpan de Juárez, Estado de México, C.P. 53000. Editor Responsable: Dr. José S. Calderón Pardo. Número de Certificado de Licitud de Título No. 10242, Certificado de Licitud de Contenido No. 7178, Número de Reserva al Título en Derechos de Autor 002892/97. Distribuida por Laboratorios Mixim, S.A. de C. V. Imprenta: Ideogramma, Av. Puebla 18 Los Reyes la Paz, Edo. de México, C.P. 56400 Tel. 5856 4902. Fecha de publicación de este número Vol. 30/2 Agosto de 2002. © DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY.

## ÍNDICE

---

Author Index .....	46
Graphical Abstracts .....	47
<b>Diterpenoids from <i>Ageratina neriifolia</i> (B. Robinson) R. King. &amp; H. Robinson</b>	
Diolimar Buitrago, Antonio Morales, Janne Rojas María E. Rondon y Alí Bahsas .....	49
<b>Nuevos catalizadores de hidrodesulfuración: Mo y NiMo soportado en MCM-41 modificada vía injertado químico</b>	
Tatiana Klimova, Armando Esquivel, Phaedra Silva y Merced Martínez .....	52
<b>Chemical constituents from <i>Zanthoxylum rugosum</i> A. ST. Hill &amp; Tul from Northeastern Brazil</b>	
Valdir A. Facundo, Selene M. de Morais, Rosemayre T. Souza and Raimundo Braz-Filho .....	61
<b>Ingenoles aislados de la especie <i>Euphorbia Cotinifolia</i> inducen apoptosis en células Jurkat</b>	
Liliana Betancur-Galvis, Javier Roldan, Gladis Morales, Jelver Sierra, Magdalena Blanco-Molina Antonio Macho, J. Alberto Marco .....	68

**INGENOLES AISLADOS DE LA ESPECIE *Euphorbia cotinifolia* INDUCEN APOPTOSIS EN CÉLULAS JURKAT**

LILIANA BETANCUR-GALVIS<sup>1</sup>, JAVIER ROLDAN<sup>2</sup>, GLADIS MORALES<sup>3</sup>, JELVER SIERRA<sup>1</sup>, MAGDALENA BLANCO-MOLINA<sup>4</sup>, ANTONIO MACHO<sup>4</sup>, J. ALBERTO MARCO<sup>5</sup>

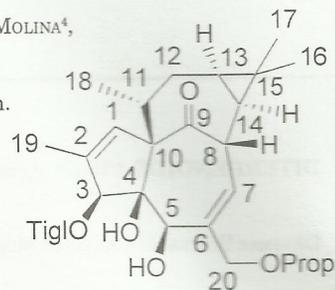
<sup>1</sup>Grupo de Inmunovirología-Biogénesis. CIM. Universidad de Antioquia A.A1226. Medellín. Colombia.

<sup>2</sup>Departamento de Biología. Universidad de Antioquia.

<sup>3</sup>Departamento de Química. Grupo GIEM. Universidad de Antioquia.

<sup>4</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. E-14071 Córdoba. España.

<sup>5</sup>Departamento de Química Orgánica. Universidad de Valencia, E-46100 Burjassot, Valencia. España.



*E. cotinifolia* showed antitumour activity *in vitro* and was thus chosen for activity-monitored fractionations and identification of its active principles. Isolation was carried out using bioassays that evaluated the mitochondrial transmembrane potential  $\Delta\Psi_m$ ; production of reactive oxygen species (ROS); and the induction of apoptosis. A compound which showed an apoptotic effect was isolated and was found to induce first the drop of  $\Delta\Psi_m$ ; and then, generated ROS. Spectral data, including 2D correlations, indicated that the compound was a diester of ingenol which is most likely 3-*O*-tigloyl-20-*O*-propionylingenol.