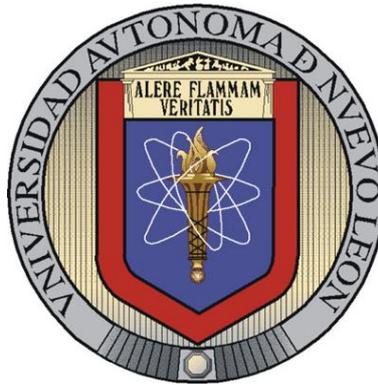


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LAS FRACCIONES HEXÁNICAS DE
Gymnosperma glutinosum (SPRENG) LESS. CONTRA EL LINFOMA MURINO
L5178Y-R.**

Por:

Q. B. P. HUMBERTO CARLOS HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS
con Acentuación en Inmunobiología.**

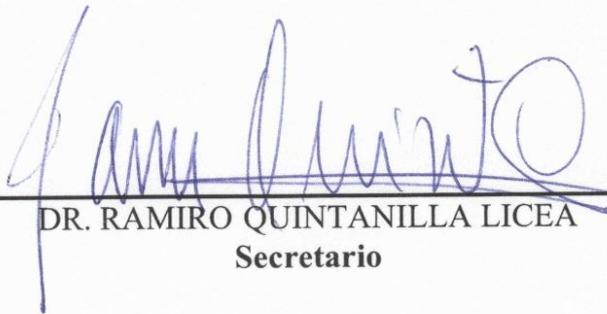
Octubre, 2012

**EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LAS FRACCIONES HEXÁNICAS DE
Gymnosperma glutinosum (SPRENG) LESS CONTRA EL LINFOMA MURINO
L5178Y-R.**

Comité de tesis



DR. RICARDO ALBERTO GÓMEZ FLORES
Director



DR. RAMIRO QUINTANILLA LICEA
Secretario



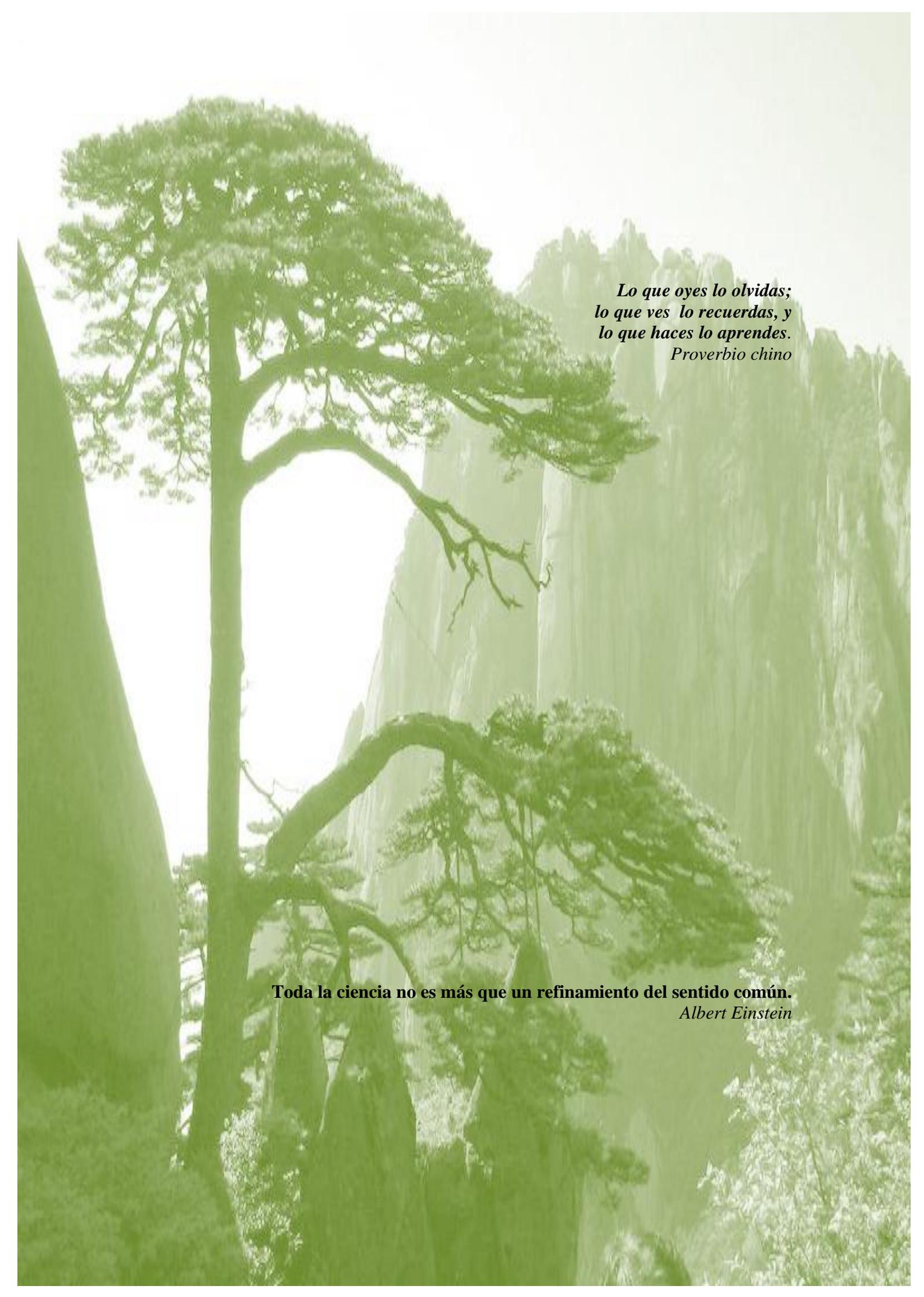
DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA
Vocal



DR. EDGAR MENDOZA GAMBOA
Vocal



DR. MOISÉS A. FRANCO MOLINA
Vocal



*Lo que oyes lo olvidas;
lo que ves lo recuerdas, y
lo que haces lo aprendes.
Proverbio chino*

Toda la ciencia no es más que un refinamiento del sentido común.
Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas, por brindarme la formación profesional.

Al Dr. Ricardo A. Gómez Flores, por su valiosa asesoría y apoyo durante la realización de este trabajo, pero sobre todo por creer en mí dándome nuevamente la oportunidad de crecer profesional y personalmente.

A la Dra. Patricia Tamez Guerra y al Dr. Ramiro Quintanilla Licea, por su amable disposición y su valiosa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca No.238322 para el desarrollo de mis estudios de maestría.

Al Dr. Edgar Mendoza y al Dr. Moisés Franco, por su apoyo, asesoría y facilidades otorgadas para realizar este trabajo.

A la Biol. Enriqueta Monreal Cuevas y a la Srita. Nora Mares, por el gran cariño que les tengo y por las vivencias inolvidables.

Al Dr. Javier Alvares, por su asesoría y su valiosa ayuda en la parte histológica de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios UIAD, UFB y Fitoquímica, por la importancia que tuvo para mí, sus comentarios, reflexiones y críticas constructivas en todo momento, ayudándome a sacar el trabajo adelante.

A mis amigos, Francis, Cynthia, Aralia, Jessy, Cindy, Raúl y Emmanuel, por las vivencias que pasamos, por hacernos ameno la estancia.

A mi familia, sobre todas las cosas, por su apoyo incondicional que me dieron durante la carrera y durante la realización de este trabajo, desde el inicio hasta el final.

A todas aquellas personas que involuntariamente omito, que de una u otra forma me apoyaron cuando de alguna manera lo necesitaba.

MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIA

A Dios, por brindarme protección, fe y fortaleza para seguir adelante.

A mis padres, Norma Cristina Martínez y Humberto Nazario Hernández, por confiar en mí, por enseñarme que no hay camino difícil para lograr lo que uno se propone, por los sacrificios y esfuerzos que pasamos para llegar a donde estoy.

A mis hermanos Stephanie Cristina y Abad Esaú, por compartir sueños, alegrías y tristezas, por ser cómplices de pequeñas travesuras y por muchas cosas más.

A mi amada novia Lucila Guadalupe, por el amor y por su apoyo incondicional que me ha brindado, pero sobre todo la paciencia que ha tenido.

A toda mi familia que me ha apoyado desde siempre.

LOS QUIERO MUCHO.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	5
LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
NOMENCLATURA.....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo General	17
3.2. Objetivos Particulares	17
4. ANTECEDENTES	18
4.1. Terminología de Cáncer	18
4.1.1. Linfoma L5178Y-R	19
4.2. Proliferación celular tumoral	20
4.3. Hepatotoxicidad	21
4.4. Compuestos de origen vegetal como terapia de cáncer	23
4.5. <i>Gymnosperma glutinosum</i>	27
4.5.1. Botánica y ecología de <i>G. glutinosum</i>	27
4.5.2. Propiedades medicinales de <i>G. glutinosum</i>	28
4.5.3. Fitoquímica de <i>G. glutinosum</i>	28
4.5.4. Estudios preliminares de <i>G. glutinosum</i>	29
5. MATERIAL Y MÉTODOS	30

5.1.	Metodología experimental.....	30
5.2.	Reactivos y medios de cultivo.....	31
5.3.	Animales de experimentación.....	31
5.4.	Material vegetal.....	31
5.5.	Extractos hexánicos de <i>G. glutinosum</i>	31
5.6.	Extracción Soxhlet.....	31
5.7.	Evaporación con Rotavapor.....	32
5.8.	Cromatografía en columna.....	32
5.9.	Cromatografía en capa fina.....	32
5.10.	Línea celular.....	33
5.11.	Mantenimiento <i>in vivo</i> de la línea tumoral L5178Y-R	33
5.12.	Mantenimiento <i>in vitro</i> de la línea tumoral L5178Y-R	34
5.13.	Congelación de las líneas celulares.....	34
5.14.	Descongelación de las líneas celulares.....	35
5.15.	Determinación de la viabilidad celular.....	35
5.16.	Actividad citotóxica de las fracciones activas de <i>G. glutinosum</i> en contra del linfoma murino L5178Y-R.....	35
5.17.	Extracción de ADN.....	37
5.18.	Detección de fragmentos de ADN.....	37
5.19.	Determinación de la actividad antitumoral <i>in vivo</i>	37
5.20.	Determinación de la actividad hepatotóxica <i>in vivo</i>	39
5.21.	Evaluación de la actividad linfoproliferativa de las fracciones hexánicas con linfocitos residentes y activados.....	41
5.22.	Análisis estadístico.....	42
6.	RESULTADOS	43
6.1.	Obtención de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i>	43
6.2.	Análisis de la actividad citotóxica de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i> sobre el crecimiento del linfoma L5178Y-R.	45

6.3.	Análisis de la mortalidad celular inducida por las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i>	48
6.4.	Análisis de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i> sobre la proliferación de linfocitos de timo y bazo <i>in vitro</i> en ausencia y presencia de mitógeno....	50
6.4.1.	Análisis de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i> sobre la proliferación de linfocitos de timo <i>in vitro</i> en ausencia y presencia de mitógeno.....	50
6.4.2.	Análisis de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i> sobre la proliferación de linfocitos de bazo <i>in vitro</i> en ausencia y presencia de mitógeno.....	55
6.5.	Análisis de la actividad antitumoral y hepatotóxica <i>in vivo</i> de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i> sobre el linfoma murino L5178Y-R.....	60
6.5.1.	Efecto de las FC6 y FC7 sobre el crecimiento tumoral.....	60
6.5.2.	Efecto de las FC6 y FC7 sobre la sobrevivencia de ratones con linfoma.....	63
6.5.3.	Análisis histológico de hígado.....	67
6.6.	Análisis de la actividad biológica de los compuestos aislados a partir de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i>	72
7.	DISCUSIÓN.....	77
8.	CONCLUSIONES.....	82
9.	APÉNDICES.....	83
10.	LITERATURA CITADA.....	91
11.	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	99

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Clasificación taxonómica de <i>G. glutinosum</i>	27
II.	Características de la línea celular L5178Y-R.....	33
III.	Grupo de tratamientos para el estudio <i>in vivo</i>	38
IV.	Técnica de deshidratación de tejidos.....	39
V.	Tinción histológica de hematoxilina y eosina.....	40
VI.	Rendimiento de la separación por cromatografía en columna del extracto hexánico de <i>G. glutinosum</i>	43
VII.	Rendimiento de la separación de SC1 por cromatografía en columna.....	44
VIII.	Efecto de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i> sobre la proliferación de linfocitos de timo <i>in vitro</i> en presencia y ausencia de mitógeno.....	51
IX.	Efecto de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i> sobre la proliferación de linfocitos de bazo <i>in vitro</i> en presencia y ausencia de mitógeno.....	56
X.	Efecto de las fracciones hexánicas sobre el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	62
XI.	Efecto de los tratamientos sobre la sobrevivencia de ratones con el linfoma L5178Y-R.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vista de la línea celular L5178Y-R.....	19
2. División celular tumoral.....	21
3. Ruta para la obtención y evaluación <i>in vitro</i> y pre-clínica de compuestos anticancerígenos a partir de plantas.....	26
4. Arbusto de <i>Gymnosperma glutinosum</i>	28
5. Hojas de <i>G. glutinosum</i>	28
6. Efecto de los extractos de crudos de <i>G. glutinosum</i> sobre el crecimiento de la línea celular L5178Y-R <i>in vitro</i>	29
7. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	30
8. Inoculación intraperitoneal de células tumorales.....	34
9. Evaluación colorimétrica de la viabilidad celular mediante la reducción de MTT.....	36
10. Método de linfoproliferación <i>in vitro</i>	41
11. Cromatografía en capa fina.....	44
12. Efecto citotóxico de las fracciones hexánicas FC1, FC3 y FC4 de <i>G. glutinosum</i> contra de la línea linfoide L5178Y-R.....	46
13. Efecto citotóxico de las fracciones hexánicas FC5, FC6 y FC7 de <i>G. glutinosum</i> contra de la línea linfoide L5178Y-R.....	47
14. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i>	48
15. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con las fracciones hexánicas de <i>G. glutinosum</i>	49
16. Efecto de las fracciones hexánicas FC1 (A) y FC3 (B) de <i>G. glutinosum</i> sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia de mitógeno.....	52
17. Efecto de las fracciones hexánicas FC4 (A) y FC5 (B) de <i>G. glutinosum</i> sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia de mitógeno.....	53

18. Efecto de las fracciones hexánicas FC6 (A) y FC7 (B) de <i>G. glutinosum</i> sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia de mitógeno.....	54
19. Efecto de las fracciones hexánicas FC1 (A) y FC3 (B) de <i>G. glutinosum</i> sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia de mitógeno.....	57
20. Efecto de las fracciones hexánicas FC4 (A) y FC5 (B) de <i>G. glutinosum</i> sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia de mitógeno.....	58
21. Efecto de las fracciones hexánicas FC6 (A) y FC7 (B) de <i>G. glutinosum</i> sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia de mitógeno.....	59
22. Efecto de los tratamientos sobre la supervivencia de ratones con linfoma.....	65
23. Probabilidad de supervivencia obtenida por el método de Kaplan-Meier.....	66
24. Corte histológico de hígado (100x), mostrando a detalle las características de los hepatocitos. Tinción H y E.....	67
25. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado con solución salina 0.9%.....	68
26. Histopatología (40x) del grupo tratado con FC6.....	69
27. Histopatología (40x) del grupo tratado con FC7.....	70
28. Histología (40x) de la triada portal hepática.....	71
29. Moléculas aisladas a partir del extracto hexánico de <i>G. glutinosum</i> ...	73
30. Efecto citotóxico del diterpeno RQ6 sobre la línea linfoide L5178Y-R.....	74
31. Efecto del RQ6 (compuesto A) sobre la linfoproliferación de células de timo (A) y bazo (B) en presencia y ausencia de mitógeno.....	75
32. Efecto citotóxico del diterpeno RQ7 sobre la línea linfoide L5178Y-R.....	76
33. Efecto de la con-A sobre la linfoproliferación de células de timo y bazo.....	84
34. Efecto citotóxico de la vincristina sobre la línea linfoide L5178Y-R.....	85

NOMENCLATURA

A₅₇₀	Absorbancia a 570 nm
ADN	Ácido Desoxiribunocleico
Act-D	Actinomicina D
ATCC	American Type Culture Collection
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
FC	Fracción
g	Gramo
h	Hora
IC	Índice de crecimiento
<i>im</i>	Intramuscular
<i>ip</i>	Intraperitoneal
<i>iv</i>	Intravenosa
L	Litro
M	Metro
μL	Microlitro
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
μg	Microgramo
μg/mL	Microgramos por mililitro
mM	Micromolar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milimetro
min	Minuto
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sodio
UV	Ultravioleta
V	Voltio

RESUMEN

Gymnosperma glutinosum se usa para el tratamiento de reumatismo, dolor de cabeza, fiebre, diarrea, úlceras y para soldar huesos fracturados; además de su empleo como diurético y vasodilatador coronario. Desde una perspectiva inmunológica, las células cancerosas pueden considerarse como células propias alteradas que han escapado a los mecanismos de regulación normal de crecimiento. Estas células dan lugar a clonas que pueden alcanzar un tamaño considerable, produciendo un tumor o neoplasia. Los objetivos del siguiente trabajo se enfocaron en estudiar los efectos *in vitro* e *in vivo* de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* en contra de linfoma murino L5178Y-R, así como también se dilucido la inducción de apoptosis en la citotoxicidad de dichas fracciones y purificar el compuesto encargado de la actividad citotóxica. Para determinar el efecto citotóxico *in vitro* se utilizó la técnica colorimétrica de reducción de la sal de tetrazolio MTT, así como también evaluamos la actividad de estas fracciones en linfocitos residentes de timo y bazo; para el efecto *in vivo* se utilizó el modelo murino utilizando la línea celular L5178Y-R y midiendo el tamaño del tumor y la sobrevivencia. Las fracciones FC1, FC3, FC4, FC5, FC6 y FC7 mostraron actividad citotóxica contra L5178YR *in vitro* de hasta el 70%, observándose la inducción de apoptosis como muerte celular, también no se afecto de forma significativa la viabilidad de células de timo y bazo *in vitro*, se evaluaron las fracciones FC6 y FC7 *in vivo* y se observó una sobrevivencia del 50%, sin toxicidad hepática. Se purificaron dos diterpenos que mostraron actividad citotóxica en contra del linfoma, induciendo la apoptosis como muerte celular. Se discute la posibilidad de que alguno de los diterpenos se use de forma terapéutica para tratar algunos canceres, aunque faltaría el estudio toxicológico de los diterpenos para aceptarlos como tratamientos seguros.

ABSTRACT

Gymnosperma glutinosum is used to treat rheumatism, headache, fever, diarrhea, ulcers and broken bones welding, in addition to its use as a diuretic and coronary vasodilator. From an immunological perspective, cancer cells can be viewed as altered self cells that have escaped normal regulation mechanisms of growth. These cells give rise to clones which can reach a considerable size, producing a tumor or neoplasm. The objectives of the present work were focused on studying the *in vitro* and *in vivo* effects of hexanic fractions of *G. glutinosum* against mouse lymphoma L5178Y-R cells; in addition, the induction of apoptosis in the cytotoxicity of these fractions was investigated and the compound responsible for the cytotoxic activity was purified. To determine the *in vitro* cytotoxic effect the MTT colorimetric technique was used; the activity of these fractions on spleen and thymus resident lymphocytes was also evaluated. For the *in vivo* effect, the L5178Y-R tumor murine model was used, measuring the tumor size and survival. Fractions FC1, FC3, FC4, FC5, FC6 and FC7 showed cytotoxic activity *in vitro* against L5178YR up to 70%, with the induction of apoptosis, without significantly affecting cell viability of thymus and spleen cells *in vitro*; FC7 and FC6 were evaluated *in vivo* and showed a 50% survival without liver toxicity observed. Two diterpenes were purified, which showed cytotoxic activity against the lymphoma cells, inducing apoptosis as the mechanism of cell death. We discussed the possibility that some of the diterpenes might be therapeutically used to treat some cancers, but toxicological studies of diterpenes are required to evaluate their potential in the clinics.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido de gran utilidad desde tiempos ancestrales. *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less., es un arbusto que se encuentra ampliamente distribuido en México (Zamora, 2001; INI 1994), y en la medicina tradicional de México se usa para el tratamiento de reumatismo, dolor de cabeza, fiebre, diarrea, úlceras y para soldar huesos fracturados. Se reporta su uso como anti-diarreico, antirreumático, analgésico, cicatricial y regenerativo; además de su empleo como diurético y vasodilatador coronario (Martínez, 1979).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, junto con las cardiopatías y la diabetes (ACS, 2010). Desde una perspectiva inmunológica, las células cancerosas pueden considerarse como células propias alteradas que han escapado a los mecanismos de regulación normal de crecimiento. Estas células dan lugar a clonas que pueden alcanzar un tamaño considerable, produciendo un tumor o neoplasia (Auyang, 2006; Goldsby *et al.*, 2002).

La hepatotoxicidad relacionada con drogas se encuentra pobremente documentada. Sin embargo, su impacto es significativo pese a la baja incidencia, dado que la hepatotoxicidad por drogas es la primera causa de insuficiencia hepática fulminante en los EUA alcanzando un 40% del total de las causas, siendo el paracetamol la droga más frecuentemente implicada (Larrey, 2002).

Existen más de 900 medicamentos, así como plantas medicinales, que se han notificado capaces de producir una enfermedad hepática inducida por drogas (Lee, 2003). Las drogas más frecuentemente implicadas en el desarrollo de hepatotoxicidad son los antibióticos, y agentes antituberculosos, anticonvulsivantes, hipolipemiantes orales y anti-inflamatorios no esteroideos (Sierra, 2004).

En los experimentos iniciales para demostrar actividad antitumoral inducida por *G. glutinosum* se observa actividad citotóxica sobre el crecimiento de la línea L5178Y-R, con los extractos de acetato de etilo (hasta 27%), metanol (hasta 25%), arrastre de vapor (hasta 45%), acetona (hasta 54%), cloroformo (hasta 54%) y hexano (hasta 41%) (Gomez-Flores *et al.*, 2009).

2. HIPÓTESIS

Las fracciones del extracto hexánico de *Gymnosperma glutinosum* poseen efectos anticancerígenos *in vitro* e *in vivo* en contra del linfoma L5178Y-R.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar y estandarizar estudios preclínicos para determinar el efecto anticancerígeno y hepatotóxico de las fracciones hexánicas activas de extractos de *Gymnosperma glutinosum*.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de las fracciones del extracto hexánico de *G. glutinosum* en contra de la línea celular L5178Y-R.
2. Determinar el mecanismo de muerte celular inducido por dichas fracciones contra la línea L5178Y-R.
3. Evaluar la actividad *in vitro* de estas fracciones en la viabilidad y proliferación de células normales de bazo y timo de ratón.
4. Evaluar la actividad antitumoral y el efecto hepatotóxico *in vivo* de las fracciones del extracto hexánico de *G. glutinosum* en contra de linfoma L5178Y-R.
5. Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los compuestos presentes en las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* en contra de la línea celular L5178Y-R.

4. ANTECEDENTES

El cáncer se ha convertido en causa principal de muerte en el mundo, junto con las cardiopatías y la diabetes (Boik, 1996, 2001; Rath, 2001; ACS, 2010). Desde una perspectiva inmunológica, las células cancerosas pueden considerarse como células propias alteradas que han escapado a los mecanismos de regulación normal de crecimiento. Estas células dan lugar a clonas que pueden alcanzar un tamaño considerable, produciendo un tumor o neoplasia (Auyang, 2006; Goldsby *et al.*, 2004).

4.1. Terminología de Cáncer

El término cáncer se refiere específicamente a un tumor maligno, que significa un crecimiento progresivo e invasor, que puede presentar metástasis; el proceso mediante el cual estas células transformadas migran a otros tejidos por la sangre o por la linfa (Qian *et al.*, 2001).

El cáncer se clasifica según el tipo de tejido; carcinomas (los de origen epitelial que constituyen la mayor parte de los cánceres glandulares, pecho, estómago, útero, piel y lengua, este es el más común >80%), leucemia/linfoma (de origen hematopoyético linfoide, aproximadamente 9%) y sarcoma (los de origen mesenquimatoso afecta el tejido óseo y muscular, alrededor 1%) (Goldsby *et al.*, 2002).

Los linfomas son neoplasmas de células B y células T que típicamente resultan en el agrandamiento de los ganglios linfáticos; sin embargo, el páncreas, la médula ósea y otros tejidos también podrían ser infiltrados. Las leucemias, por su parte, son el resultado de células neoplásicas provenientes de linfomas que circulan por la sangre.

Ciertos factores son capaces de originar cáncer en un porcentaje de los individuos expuestos a ellos. Entre éstos se encuentran: la herencia, los productos químicos, las radiaciones ionizantes, las infecciones bacterianas o virales y traumas. Los investigadores estudian como estos diferentes factores pueden interactuar de una manera multifactorial y secuencial para producir tumores malignos. El cáncer es, en esencia, un proceso genético. Las alteraciones genéticas pueden ser heredadas, o producidas en

alguna célula por un virus o por una lesión provocada de manera externa (Villalva, 2007).

4.1.1. Linfoma L5178Y-R.

La línea celular L5178Y-R (Figura 1) se obtuvo a partir de un tumor tímico inducido en un ratón DBA/2 con 3-metilcolantreno; el tumor se adaptó a una suspensión de células, se ha mantenido por pases *in vivo* en su hospedero singénico (Beer *et al.*, 1983). En 1959, Fischer, formuló un medio de cultivo que permitió su cultivo *in vitro*. Esta línea celular se emplea ampliamente para estudios de radiosensibilidad y toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que al inocularse vía intramuscular (*im*) en ratones DBA/2 o Balb/c, crece en forma sólida como linfoma, además de ser resistente a rayos X. A pesar de la relación hospedero-huésped, se ha encontrado que el linfoma L5178Y-R es inmunogénico en ratones DBA/2.

La ventaja potencial de un sistema de modelo de tumor ascítico sería de disminuir la semejanza entre los tumores espontáneos de origen linfoide. Tales tumores se presentan generalmente rodeados por una matriz de células huésped-linfoide asociadas y para algún contacto con la vía sanguínea del hospedero que ofrece una importante característica entre la interacción tumor – hospedero.

El uso de un modelo de tumor ascítico como el linfoma L5178-Y también facilita la investigación de un papel posible en el rechazo de los macrófagos en el tumor. La utilización de un tumor en su forma ascítica evita la necrosis de las células del tumor durante el crecimiento temprano, permitiendo así una estimación más exacta del índice del crecimiento del tumor.

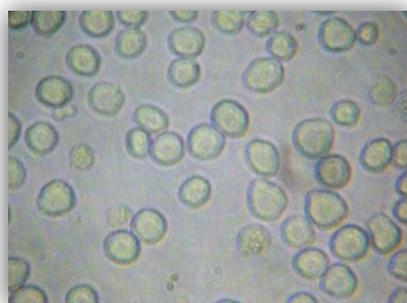


Figura 1. Vista de la línea celular L5178Y-R

4.2. Proliferación celular tumoral.

En los órganos y tejidos maduros hay un balance entre la renovación y muerte celular (Figura 2), conforme las células mueren, nuevas células se van generando por procesos de proliferación y diferenciación celular; bajo condiciones normales la producción de nuevas células está regulada de modo que el número de células de cada tipo se mantenga constante (Gavrieli *et al.*, 1992). Las células que envejecen o las que ya no son requeridas mueren, mediante un proceso programado de mecanismos celulares y moleculares complejos que recibe el nombre de apoptosis (Zandman-Goddard y Blank, 2002; Sanchez-Torres y Diosdado-Vargas, 2003). Las células cancerosas presentan un defecto en el proceso de apoptosis (Figura 2). Las vías de la regulación de la apoptosis están controladas por varios factores, entre los que se encuentran estímulos fisiológicos como la presencia de señales de muerte celular dadas por factores de necrosis tumoral (TNF), neurotransmisores, calcio o por falta de factores de crecimiento, y se dirige por un grupo de genes que produce proteínas reguladoras e inhibidoras en cascada. Los genes claves para esta cascada de señales son, los efectores como el p53, c-myc, nur77, erg-1, ICE (subfamilia de enzima caspasa), RP-2, RP-8 que inducen apoptosis cuando se sobre-expresan en varios sistemas celulares; y su contraparte, los inhibidores de muerte celular como el Bcl-2 que regula negativamente la apoptosis mediada por p53 y c-myc; y potenciadores, como Bax y Bcl-xs, que promueven la apoptosis tras unirse al Bcl-2 y suprimir su efecto inhibidor de apoptosis (Boise, 1993; Oltvai *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1994).

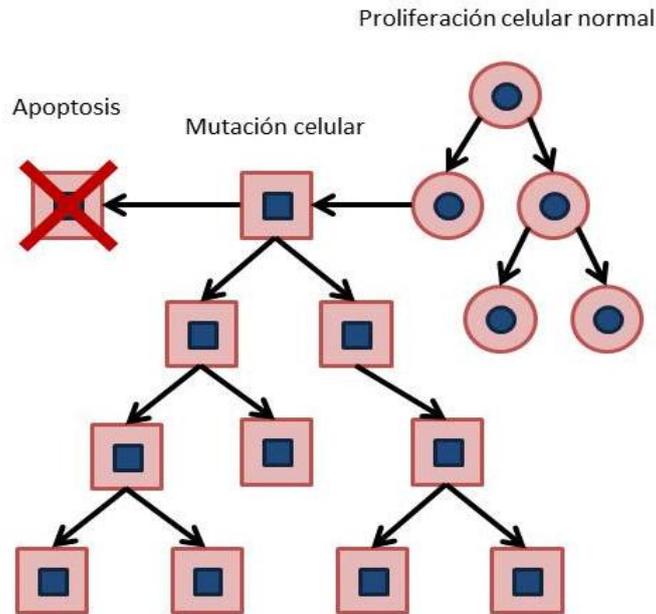


Figura 2. División celular tumoral.

4.3. Hepatotoxicidad

La hepatotoxicidad se define como la lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos (Navarro, 2006), por tal motivo es de vital importancia determinar si el extracto y compuestos bioactivos de *G. glutinosum* presentan toxicidad *in vivo*.

Existen una enorme diversidad de fármacos y productos químicos capaces de generar daño hepático además del daño ocasionado por agentes infecciosos, alteraciones del flujo biliar, causas metabólicas, congénitas o autoinmunes. El hígado ha sido considerado el principal responsable de la destoxificación de sustancias exógenas, por un lado debido a su estratégica localización lo cual le permite actuar como barrera contra las toxinas ingeridas y por otro lado, ha desarrollado evolutivamente una gran reserva de sistemas enzimáticos que le permite cumplir dicho rol. Sin embargo, es sabido que los productos resultantes de algunos procesos metabólicos derivan en compuestos de mayor toxicidad. Este aspecto es de vital importancia en algunos de los mecanismos de hepatotoxicidad y hepato-carcinogenicidad. Existen algunos compuestos que son eliminados sin ningún tipo de alteración. Sin embargo, la mayoría son

eliminados luego de sufrir un proceso de biotransformación que tiene como objetivo principal introducir una serie de modificaciones químicas en la molécula que la transforme de liposoluble en hidrosoluble y de no polar en polar, facilitando de esta manera su excreción no sólo por orina, sino también por bilis y en menor proporción por sudor y saliva. Por otro lado, los compuestos exógenos no polares o insolubles en agua tienden a acumularse por lo que es necesario convertirlos en productos polares para ser eliminados. Lo mismo ocurre con los metabolitos endógenos, por ejemplo del hemo (bilirrubina) y las hormonas (esteroides). Las enzimas que intervienen en los procesos de biotransformación se encuentran en diversos compartimientos sub-celulares. Estos sistemas enzimáticos, si bien son más abundantes en el hígado, también se encuentran en el tubo digestivo, la flora intestinal, los pulmones, la piel, los riñones y la mucosa nasal (Castro-Martínez *et al.*, 2011; Tejada-Cifuentes 2010; Lee 2003).

De acuerdo a la fuente de exposición, los agentes hepatotóxicos pueden ser clasificados en naturales o sintéticos, siendo la gran mayoría de origen sintético. Los agentes hepatotóxicos provenientes de fuentes naturales son los metales o metaloides presentes en la naturaleza y las toxinas producidas por plantas, hongos o bacterias. Los agentes provenientes de fuentes sintéticas son principalmente los producidos por la industria química y farmacéutica. A su vez, dentro de los agentes de origen sintético se pueden incluir los subproductos o materiales de desecho de la industria, además de los productos medicinales, no-medicinales y las drogas de abuso (Castro-Martínez *et al.*, 2011; Tejada-Cifuentes 2010).

La hepatotoxicidad relacionada con drogas se encuentra pobremente documentada posiblemente por la dificultad de establecer un diagnóstico definitivo. La incidencia global de hepatotoxicidad es baja y si bien es difícil de estimar, se calcula entre 1 de cada 10.000 a 1 cada 100.000 pacientes según un estudio francés (Sgro *et al.*, 2002). Sin embargo, su impacto es significativo pese a la baja incidencia, dado que la hepatotoxicidad por drogas es la primera causa de insuficiencia hepática fulminante en los EU alcanzando del 20% al 40% del total de las causas, siendo el paracetamol la droga más frecuentemente implicada (Larrey, 2002). Existen más de 900 medicamentos, así como plantas medicinales, que se han notificado capaces de producir una enfermedad hepática inducida por drogas (Lee, 2003). Las drogas más frecuentemente implicadas en el desarrollo de hepatotoxicidad son los antibióticos, antituberculosos,

anticonvulsivantes, hipolipemiantes orales y anti-inflamatorios no esteroides (diclofenaco), y en adolescentes, las causas más importantes son el consumo de cocaína, éxtasis e isotretinoína (Sierra, 2004).

Las reacciones adversas que afectan al hígado son más difíciles de definir, por lo que dicho concepto ha sido establecido por reuniones de consenso que incluye al menos una de las siguientes alteraciones de los análisis bioquímicos hepáticos: 1) Aumento de la alanina aminotransferasa (ALT o TGP) más de dos veces el límite alto de la normalidad; 2) Aumento de la concentración de bilirrubina directa (BD) sérica más de dos veces el límite alto de la normalidad; 3) Aumento de aspartato aminotransferasa (AST o TGO), fosfatasa alcalina (FA) y de la concentración total de bilirrubina (BT), siempre que uno de ellos supere más de dos veces el límite alto de la normalidad (Benichou, 1990).

4.4. Compuestos de origen vegetal como terapia de cáncer

La búsqueda de propiedades curativas en las plantas se remonta a tiempos ancestrales; culturas de todo el mundo han usado infusiones de miles de plantas nativas, y en muchas ocasiones se ha obtenido alivio de los síntomas o inclusive la cura del padecimiento (Murphy, 1999). A principios del siglo pasado, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica fueron detonantes de una nueva producción de medicamentos por parte de la industria farmacéutica, para la obtención de muchos de ellos se utilizaron los principios activos de plantas medicinales, al fin de poder extraerlo y así sintetizarlo en cantidades superiores al que se encuentra en la planta (Abreu y Branco, 2003; García-Alvarado *et al.*, 2001).

Guiados por la medicina tradicional o etnobotánica, existen numerosos artículos científicos que describen programas de investigación de nuevas drogas a partir de plantas; estas investigaciones están dirigidas principalmente al desarrollo de drogas con actividad anticáncer o anti-VIH, que son la principal preocupación de salud (Fabricant y Farnsworth, 2001). De hecho, varias plantas han sido validadas científicamente, e incluso se han aislado sus compuestos activos, y son drogas que se utilizan para el tratamiento de cáncer en la actualidad. Existen por lo menos 120 compuestos químicos

derivados de plantas que son considerados como drogas de importancia médica, que son comercializados por industrias farmacéuticas en más de un país del mundo (Taylor, 2000).

Una característica que hace tan atractivos para la investigación a los compuestos de origen natural como agentes anticancerígenos, es la capacidad de éstos para interactuar con los sistemas biológicos, dado que las moléculas que éstos producen, intervienen en procesos similares y generalmente no causan daño a las células normales, además tienen la ventaja de encontrarse biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre si, de forma que se reducen sus efectos secundarios y la posibilidad de acumularse en el organismo a diferencia de los tratamientos químicos (Underhill, 2005). Sin embargo, y a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos realizados sobre las plantas medicinales, todavía no se conoce la mayoría de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. De hecho, a principios de 1960, el Centro Nacional de Cáncer (NCI) en Estados Unidos de América inició un programa de investigación de extractos de diferentes plantas con potencial antitumoral.

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos secundarios para la supervivencia en el ecosistema, estas sustancias también llamadas fitoquímicos pertenecen principalmente a tres clases de compuestos de tipo de terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (Wink, 1999). Los terpenos son lípidos que le brindan el sabor u olor característico de cada planta, por lo que frecuentemente se aíslan en forma de aceites esenciales; son metabolitos secundarios que contienen alta cantidad de compuestos con estructura base de isopreno, cuya fórmula química es $C_{10}H_{16}$ (Murphy, 1999) y se dividen de acuerdo a las unidades de isopreno que contengan en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, politerpenos (Romo De Vivar, 1985). Podemos citar varios terpenos con actividad antitumoral como el taxol (paclitaxel), aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt., que es una de las drogas más importantes de la última década (Abreu y Branco, 2003); se utiliza para el tratamiento del cáncer ovárico (Wani *et al.*, 1971). Recientemente este compuesto se aprobó por la FDA; además, resulta promisorio en otros tipos de tumores malignos (Arbuck y Blaylock, 1995). Otro terpeno conocido por su potencial antitumoral es el *d*-limoneno; es el compuesto más abundante en el aceite de varios cítricos (naranja, limón,

mandarina, etc.). Existen investigaciones que validan su actividad antitumoral (Maltzman *et al.*, 1989; Crowell *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1999), la cual radica principalmente en la inducción de apoptosis, debido a la capacidad de inhibir la transferasa de la proteína farnesil y la asociación de p21ras con la membrana celular. La hiperforina es otro terpeno derivado de la planta *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) que posee actividad antitumoral en estudios *in vivo* e *in vitro* mediante el mecanismo de apoptosis (Beerhues, 2006; Gartner *et al.*, 2005; Schempp *et al.*, 2002). Otro compuesto de naturaleza terpenoide aislado del árbol *Brucea antidysenterica* utilizado en Etiopía para el tratamiento del cáncer es la Bruceantina; se encuentra en fase clínica II, y tiene la capacidad de inducir diferenciación celular y apoptosis en diferentes leucemias y linfomas, producir regresión en melanomas y cáncer de colon *in vitro* (Cuendent y Pezzuto, 2004; Cuendent *et al.*, 2004).

Por su parte, los alcaloides pueden ser definidos como aminas aromáticas que destacan por sus propiedades fisiológicas (Kaufman *et al.*, 1999). El alcaloide más conocido es la morfina, que se obtiene de la planta *Papaver somniferum* (Duke, 1973). Dentro de esta clase de compuestos también se encuentran dos de las drogas quimioterapéuticas más importantes y ampliamente usadas; la vincristina y la vinblastina, desarrolladas originalmente de un remedio popular en base a la planta *Catharanthus roseus* (*Vinca roseus*) llamada comúnmente teresita. Dichos alcaloides poseen actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, y se utilizan para el tratamiento del linfoma Hodgkins y la leucemia aguda infantil; estas tienen como mecanismo anticancerígeno el desensamblaje de microtúbulos, y la mitosis se detiene en metafase (Pinn, 2001).

Los pasos esenciales para el aislamiento de fármacos de origen natural empieza con la selección de la planta (Figura 3). Después la obtención de metabolitos secundarios mediante la extracción de solventes orgánicos, como hexano, metanol, diclorometano, etanol, entre otros, los extractos se pueden fraccionar con sílica gel. Posteriormente se corren ensayos *in vitro* para cuantificar la proliferación de células cancerosas (pruebas de tamizaje). El extracto es fraccionado con el fin de aislar compuestos puros, para lo cual se utiliza principalmente cromatografía en columna, donde se aplican secuencialmente solventes orgánicos con diferente polaridad, de este modo se obtienen fracciones las cuales se vuelven a analizar *in vitro* para identificar la

bio-actividad. La parte más crítica en el descubrimiento de fármacos son los ensayos con animales de laboratorio, ya que al pasar exitosamente las pruebas *in vivo* se magnifica la posibilidad de tener el mismo éxito con humanos. Finalmente para hacer la identificación puntual del compuesto activo se utilizan técnicas como espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, así como espectroscopia de infrarrojo y ultravioleta (Serna-Saldivar, 2006; Wink, 1999).

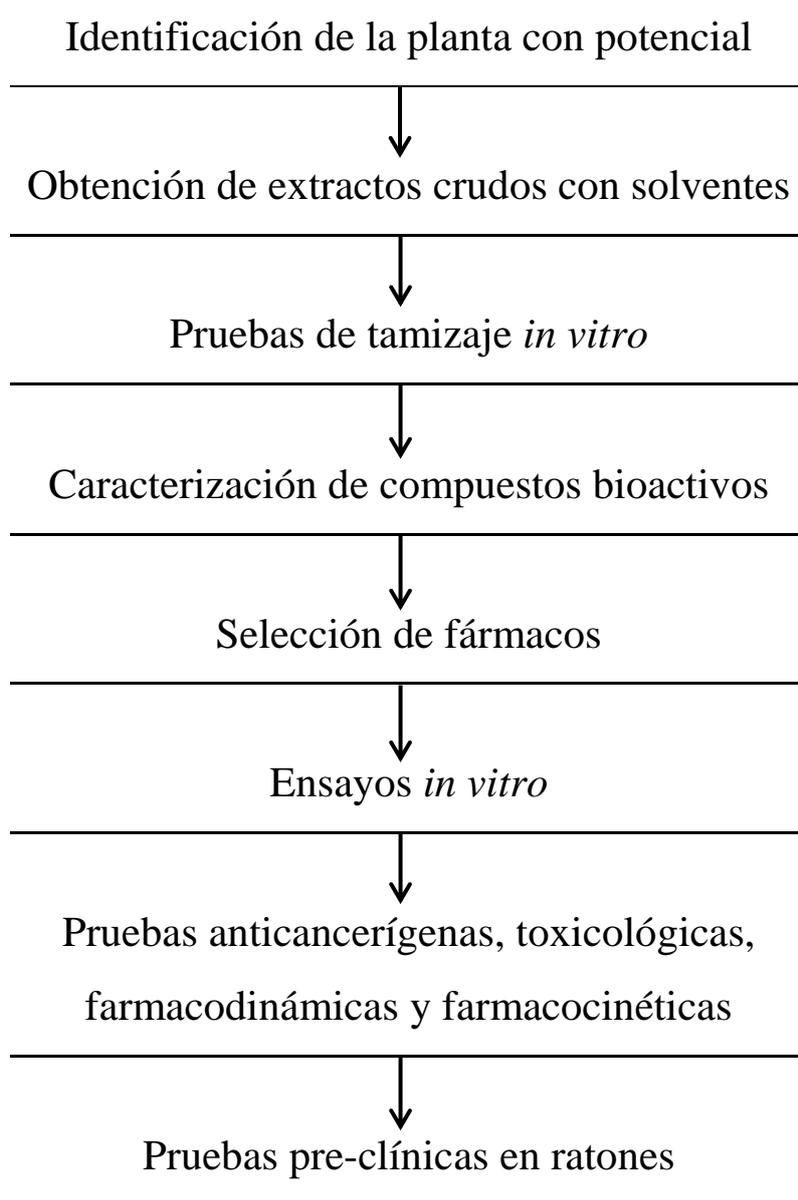


Figura 3. Ruta para la obtención y evaluación *in vitro* y pre-clínica de compuestos anticancerígenos a partir de plantas.

4.5. *Gymnosperma glutinosum*

G. glutinosum (Figuras 4 y 5) se conoce popularmente como tatalencho, escobilla, jarilla, pegarrosa, tezozotla, xonequiletl, zacayuchi, xinecuite, dependiendo de la zona del país (INI, 1994).

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>G. glutinosum</i>	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnolipsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Género	<i>Gymnosperma</i>
Especie	<i>glutinosum</i>

4.5.1. Botánica y Ecología de *G. glutinosum*

G. glutinosum es un arbusto de altura máxima de 1.20 m, cuyos tallos moderadamente ramificados tienen la característica de exudar un material pegajoso, hojas lineares lanceoladas 1-8.5 cm de largo y 1-9 mm de ancho y agudas en el ápice, las flores son de color amarillo, angostas y pequeñas y se les encuentra en cabezuelas sobre las puntas de la planta. Es originaria de América y está presente en clima templado, entre los 2250 y los 3000 m sobre el nivel del mar. Se encuentra asociada a bosques de encino, de pino y mixtos encino-pino o pino-encino. Se distribuye en los estados de Nuevo León, Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca (Zamora, 2001; INI, 1994).



Figura 4. Arbusto de *G. glutinosum*



Figura 5. Hojas de *G. glutinosum*

4.5.2. Propiedades Medicinales de *G. glutinosum*

En la medicina tradicional de México se usa para el tratamiento de reumatismo, dolor de cabeza, fiebre, diarrea, úlceras y para soldar huesos fracturados. A lo largo de la historia existen diversos reportes donde se describen propiedades medicinales de esta planta, en el siglo XVI, Martín de la Cruz la señala como pectoral, al inicio de siglo XX el Instituto Médico Nacional describe su uso como antipalúdico, diurético, digitálico y antiséptico. Posteriormente se reporta su uso como anti-diarreico, antirreumático, analgésico, cicatricial y regenerativo; además de su empleo como diurético y vasodilatador coronario (Martínez, 1979). Aunque existen estudios sobre la actividad antimicrobiana de *G. glutinosum* (Caballero-Nieto *et al.*, 2003; Canales *et al.*, 2007; Gomez-Flores *et al.*, 2008), no existen reportes sobre una relación entre la estructura de los productos naturales aislados y citotoxicidad hacia células tumorales de mamíferos.

4.5.3. Fitoquímica de *G. glutinosum*

En las partes aéreas se ha detectado la presencia de esteroides y triterpenos. Las hojas, tallos y flores contienen un aceite esencial, una resina y un compuesto similar al ácido gálico. En los estudios fitoquímicos realizados hasta ahora, se ha encontrado la presencia de más de 20 flavonoides a partir de los extractos alcohólicos y de cuatro diterpenos (Calderon *et al.*, 2001; Maldonado *et al.*, 1994) a partir de los extractos hexánicos de esta planta.

4.5.4. Estudios preliminares de *G. glutinosum*

Los experimentos iniciales para demostrar actividad antitumoral inducida por *G. glutinosum* involucraron el uso de metanol absoluto y otros solventes de diferente polaridad para separar compuestos orgánicos de las hojas de la planta. En tales resultados se observa actividad citotóxica sobre el crecimiento de la línea L5178Y-R con los extractos de hexano (hasta 40%), cloruro de metileno (hasta 16%), cloruro de metileno y metanol (hasta 25%) (Figura 6) (Gomez-Flores *et al.*, 2009).

Con relación a la inducción de apoptosis, los datos preliminares obtenidos indican que la muerte ocasionada por los extractos presenta un patrón característico de fragmentación del ADN (Gomez-Flores *et al.*, 2009).

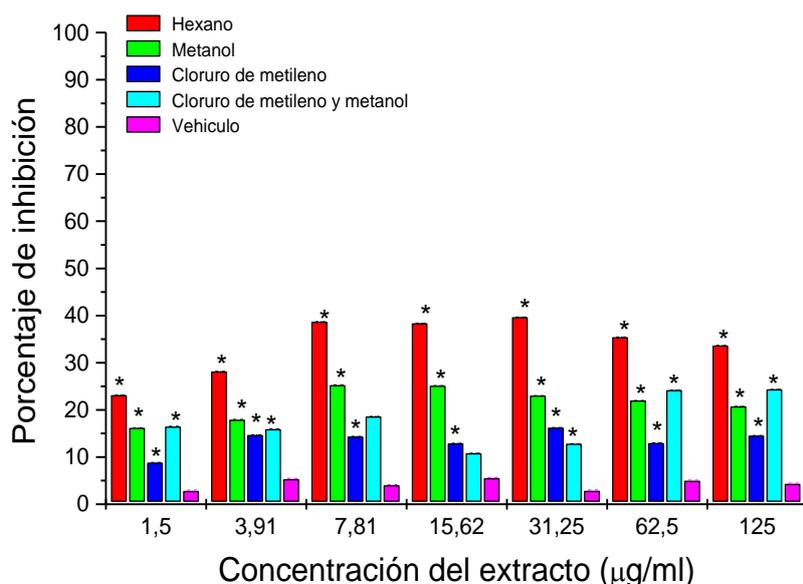


Figura 6. Efecto de los extractos crudos sobre el crecimiento de la línea celular L5178Y-R *in vitro*. Las células (5×10^4 cel/mL) fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones (125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 µg/ml) de los extractos crudos durante 48 h; la proliferación celular se midió usando la técnica colorimétrica del MTT leyendo las densidades ópticas (D.O.) a 540nm, en un lector de microplacas. La D.O. para el control sin tratar fue de 0.920 ± 0.016 . Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$, comparado con el control sin tratar (Gomez-Flores *et al.*, 2009).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Metodología científica

Para el cumplimiento de los objetivos se realizó la estrategia experimental que se resume en la Figura 7.

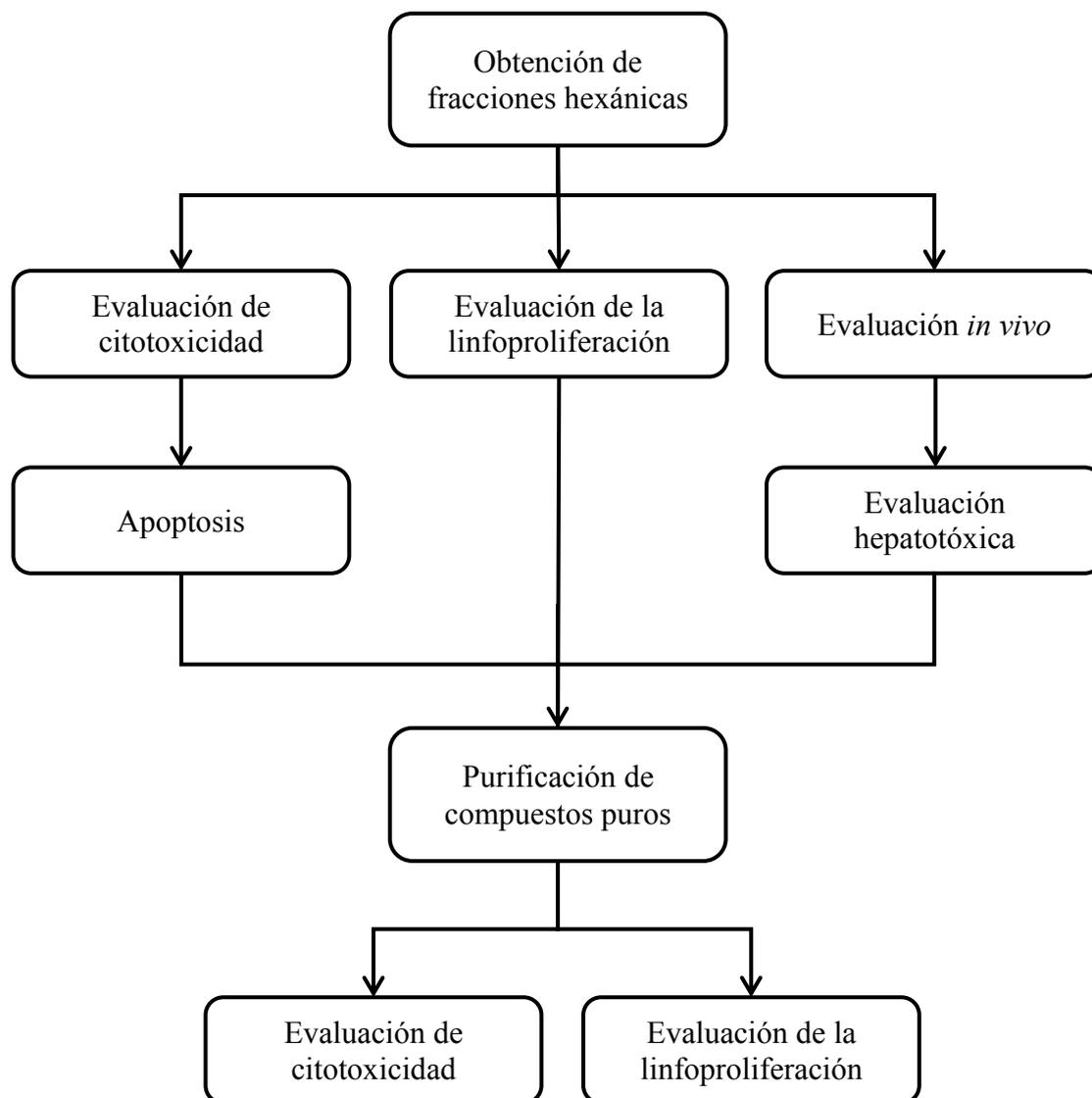


Figura 7. Diagrama de flujo de la estrategia experimental

5.2. Reactivos y medios de cultivo

La solución de penicilina-estreptomicina, L-glutamina, fungizona y medio RPMI-1640 se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY). El suero fetal bovino (SFB), el metanol, la solución amortiguadora de lisis para eritrocitos, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), la gentamicina, el PBS y los filtros millipore de 0.22 μm se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

5.3. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembras Balb/c (H-2^d) (Harlan Sprague Dawley Inc., Indianápolis, IN) de 4-6 semanas de edad. Durante el experimento, los ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a una temperatura de 24°C, bajo un ciclo de luz-oscuridad (fase lumínica 07:00-19:00 h) y se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

5.4. Material vegetal

En el presente estudio se utilizaron hojas (Fig. 4 y 5) de arbustos recolectados en el municipio de Escobedo del estado de Nuevo León, México; esta planta fue identificada en el laboratorio de Fanerógamas del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL, por la Biol. Ma. Del Consuelo González de la Rosa; su identificación fue corroborada con el espécimen No. 5101 del Herbario Institucional de la misma Facultad (Tabla 1). Las hojas fueron lavadas, para eliminar los restos de insectos y polvo, y secadas al sol por una semana para su posterior pulverización con ayuda de un molino manual.

5.5. Extractos hexánicos de *G. glutinosum*

La extracción del material vegetal se realizó en el laboratorio de Fitoquímica por medio del método Soxhlet, en el cual se utilizaron 440 g de las hojas de la planta (previamente pulverizadas) y se colocaron en un cartucho de celulosa Whatman 33 X 80 mm, que fue sometido a la extracción Soxhlet.

5.6. Extracción Soxhlet

Este método de extracción líquido-sólido se eligió ya que es muy eficaz para pasar el solvente puro continuamente por el material sólido. La extracción es muy

práctica ya que se recupera la mayor parte de los productos naturales contenidos en el material vegetal. En el presente trabajo se utilizaron 2.2 L de solvente (hexano) en un matraz redondo para comenzar la extracción que tuvo una duración de 40h.

5.7. Evaporación con Rotavapor

Este proceso se basa en separar el solvente de los extractos mediante un sistema de vacío por medio de una bomba mecánica. Este tiene que estar conectado a un condensador, el vacío está controlado por un manóstató y un manómetro. Este aparato cuenta con un sistema de rotación y un baño calentador donde se calienta el extracto para la evaporación del solvente y luego su condensación. Este condensado cae en otro matraz donde es separado, quedando en el matraz original el extracto de forma sólida. El rotavapor utilizado fue Rotavapor Büchi R – 205 (Büchi Labortechnik AG, Schwitzerland).

5.8. Cromatografía en columna

La cromatografía en columna es una técnica que permite separar físicamente y cuantificar los distintos componentes de una solución. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y la otra móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido. Las sustancias que permanecen más tiempo libres en la fase móvil, avanzan más rápidamente con el flujo de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir. En nuestra evaluación se colocó la solución del extracto vegetal en la columna cromatográfica y el corrimiento para la separación contó con una fase estacionaria de sílica gel (J. T. Baker 60 – 200 mesh) y como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano – cloroformo - acetato de etilo – metanol.

5.9. Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina fue la técnica cualitativa que nos permitió revisar la pureza de los componentes del extracto separados mediante la cromatografía en columna. Esta consistió de una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica gel, la cual estaba mezclada con sulfato de calcio como fraguante. La mezcla a separar, disuelta en una pequeña cantidad de solvente, se colocó mediante un capilar en uno de los extremos de la cromatoplaca. Ésta se introdujo a continuación en una cuba

cromatográfica la cual contenía una cierta cantidad de la fase móvil (eluyente). El eluyente sube por capilaridad a través de la cromatoplaca lográndose la separación de los componentes de la mezcla en base al equilibrio entre la adsorción de los componentes sobre la sílica y la solución de los mismos en el eluyente. Una vez terminado el proceso de separación, la cromatoplaca se sacó de la cuba y después de secarse al aire se observó bajo una lámpara de luz ultravioleta, donde se observaron como manchas los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatoplaca.

5.10. Línea celular

La línea tumoral L5178Y-R (Tabla II) se obtuvo de la ATCC.

Tabla II. Características de la línea celular L5178Y-R

<i>Morfología</i>	Células tipo linfoide
<i>Tejido</i>	Linfoide
<i>Origen</i>	Timo de ratón de DBA/2
<i>Crecimiento</i>	Suspensión (Figura 1).
<i>Procedencia</i>	ATCC
<i>Características</i>	Leucemia murina originada a partir de ratón DBA/2 tratado en el timo con metilcolantreno, se deriva la línea celular L5178Y, resistente a rayos X y altamente tumorigénica.
<i>Aplicaciones</i>	Análisis de citotoxicidad y de radiación
<i>Referencias</i>	Beer <i>et al.</i> , 1984. Br. J. Cancer Suppl. 6: 107-111.

5.11. Mantenimiento *in vivo* de la línea tumoral L5178Y-R

Para el mantenimiento del linfoma *in vivo* se utilizaron ratones hembras Balb/c, que se inocularon vía intraperitoneal (*ip*) en la parte media de la región ventral-abdominal (Figura 8) con la suspensión (200µL) de la línea tumoral L5178Y-R, a una concentración de 1×10^7 células/mL en PBS. De doce a quince días posteriores a la inoculación, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el líquido ascítico y se colectaron en tubos cónicos de 50mL con tapón de rosca (Corning, New York, NY, USA) en 10mL de PBS a pH 7.2 (durante la recolección de las células se

mantuvieron en frío el líquido peritoneal para mantener la viabilidad celular). Las células se lavaron por centrifugación a 1800rpm durante 10min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 10mL de PBS. Después se realizó la cuenta con azul tripano (Sigma-Aldrich) y ajuste celular para el inóculo nuevo en el ratón.



Figura 8. Inoculación intraperitoneal de células tumorales

5.12. Mantenimiento *in vitro* de la línea tumoral L5178Y-R

Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), 2mM glutamina (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) y antibióticos (0.5% de solución penicilina-estreptomicina, 0.1% de fungizona (Sigma-Aldrich). Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda, conteniendo un 5% de CO₂ en frascos de 25cm³ (Corning). Se revisaron periódicamente para verificar la viabilidad de las mismas.

5.13. Congelación de las líneas celulares

Para asegurar la disponibilidad de las líneas celulares en el laboratorio, se congelaron muestras (stocks) de aproximadamente 2×10^7 células/mL, para lo cual las células se concentraron mediante centrifugación a 1800 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el concentrado celular se resuspendió en medio de cultivo conteniendo 20% de SFB y 10% de DMSO como amortiguador de congelamiento, que impide la formación de cristales de agua en el interior de las células, manteniendo la integridad

celular, y se dispensó 1mL por criotubo (Corning); este material se almacenó a -70°C durante una semana y después se guardó en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento que se utilizó.

5.14. Descongelación de las líneas celulares

Se descongeló el criotubo rápidamente y una vez descongelado, el volumen de células se pasó a un tubo con 5mL de medio de cultivo RPMI frío y se llevó a centrifugar 5min a 1800 rpm a 4°C , se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 5mL de medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de SFB, previamente atemperado a 37°C en un frasco de 25 cm^2 y se dejó en incubación a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

5.15. Determinación de la viabilidad celular

El uso del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) brinda la posibilidad de cuantificar la proliferación de linfocitos y la citotoxicidad en células normales. La actividad del compuesto es en base a su acción por la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, el cual es reducido a azul de formazán, observando un cambio de color, el cual puede ser medido mediante espectrofotometría (Mosmann *et al.*, 1983)

5.16. Actividad citotóxica de las fracciones activas de *G. glutinosum* en contra del linfoma murino L5178Y-R

Se utilizó una técnica colorimétrica para determinar el potencial de los extractos y fracciones activas de *G. glutinosum* de inhibir el crecimiento celular de la línea tumoral a diferentes concentraciones. Para esto, se tomó una alícuota del cultivo celular y se lavó una vez con RPMI-1640 mediante centrifugación a 1800rpm por 10min; posteriormente se resuspendió en medio RPMI completo y se ajustó a 5×10^4 células/mL. Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano (Corning), conteniendo cultivos por triplicado en alícuotas de $100\mu\text{L}$ donde previamente se colocaron $100\mu\text{L}$ del tratamiento (fracciones hexánicas) a diferentes concentraciones en diluciones seriadas 1:2, partiendo de $250\mu\text{g/mL}$, $100\mu\text{L}$ del antineoplásico vincristina ($100\mu\text{g/mL}$) como control positivo y $100\mu\text{L}$ de medio de cultivo como control de crecimiento. Posteriormente, se incubaron los cultivos durante 48h a 37°C en una

atmósfera de 5% CO₂ y 95% de aire. Al finalizar este período, se colocaron 15µL de MTT a una concentración final de 0.5mg/mL y se incubaron las placas durante 3h adicionales, después de lo cual se añadieron 80µL de DMSO a todos los pozos y se determinaron las densidades ópticas (D.O.) en el lector de microplacas (DTX 880 Multimode detector, Becton Dickinson, Austria) a 570 nm (Gomez-Flores *et al.*, 2010) (Figura 9).

El ensayo del MTT mide la actividad metabólica de las células que se basa en la ruptura del anillo de tetrazolio del MTT por diferentes deshidrogenasas mitocondriales, generándose cristales de formazán que pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células metabólicamente activas (Mosmann, 1983).

El porcentaje de inhibición se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{A_{570} \text{ de células tratadas con extracto}}{A_{570} \text{ de células no tratadas}} \times 100$$

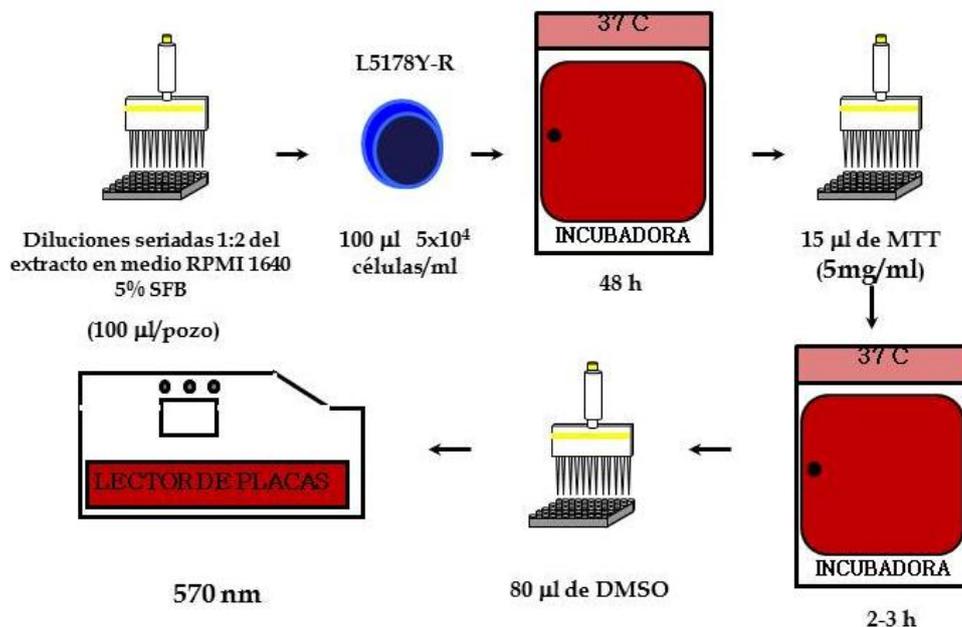


Figura 9. Evaluación colorimétrica de la viabilidad celular mediante la reducción del MTT.

5.17. Extracción de ADN

Las células se incubaron 6 y 24h con las fracciones hexánicas y con los respectivos controles negativo (medio de cultivo), positivo (actinomicina D) y vehículo; finalizado el tiempo de incubación las células se colectaron y se centrifugaron a 2000rpm durante 10min. Posteriormente se lavaron con PBS y la extracción se realizó por medio del kit *Wizard Genomic DNA purification*® de la forma sugerida para células en cultivo.

5.18. Detección de fragmentos de ADN

El extracto de ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%; se utilizó buffer SB para el corrimiento electroforético a 70V durante 20min y 40V durante 1h. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñió con bromuro de etidio 5ng/mL y las fotos se documentaron bajo luz UV (*High Performance Ultraviolet Transilluminator*, UVP).

5.19. Determinación de la actividad antitumoral *in vivo*

Se utilizó el modelo experimental en ratones Balb/c al cual se le administró el linfoma L5178Y-R, previamente descrito (Gomez-Flores *et al.*, 2005). En este modelo se utilizaron ratones hembras Balb/c (H-2^d) de 6-8 semanas de edad que fueron inoculadas vía intramuscular (*im*) sobre el muslo de la extremidad posterior derecha con 5x10⁶ células del linfoma L5178Y-R suspendidas en un volumen de 200µL de PBS. Después de 7d (tiempo en el cual se forma el tumor de aproximadamente 100cm³), se administraron los tratamientos cada tercer día durante 20d, sumando un total de 5 inoculaciones (Tabla III).

Las medidas del volumen tumoral y peso se empezaron a registrar después de siete días de la inoculación del tumor, en un esquema de veinte días con frecuencia de cada tercer día. El volumen tumoral se estimó midiendo largo y ancho (mm) del tumor con la ayuda de un vernier digital (Mitotoyo, Japón); el volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = \frac{\text{Largo} \times \text{Ancho}^2}{2}$$

Tabla III. Grupo de tratamientos para el estudio <i>in vivo</i>			
Grupo	Tratamiento	Descripción del tratamiento	Dosis
I.	Vehículo <i>im</i>	Se inoculó vía <i>im</i> en el sitio del tumor la solución conteniendo sólo vehículo.	Cada 3 ^{er} día
II.	FC6 <i>im</i>	Se inoculó vía <i>im</i> en el sitio del tumor, el compuesto a una concentración de 0.5mg/Kg disuelto en el vehículo.	Cada 3 ^{er} día
III.	FC7 <i>im</i>	Se inoculó vía <i>im</i> en el sitio del tumor, el compuesto a una concentración de 0.5mg/Kg disuelto en el vehículo.	Cada 3 ^{er} día
IV.	Control positivo	Se inoculó vía <i>iv</i> en la vena caudal, el compuesto antineoplásico vicristina (Vintec®) a una concentración de 0.05mg/Kg	Cada 7 ^{mo} día
V.	Control sin tumor	Ratones sin tratar y sin crecimiento tumoral	

La sobrevivencia entre los 20-60 d se monitoreó diariamente y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{\# \text{ de ratones sobrevivientes} \times 100\%}{\# \text{ total de ratones}}$$

5.20. Determinación de la actividad hepatotóxica *in vivo*

Para determinar la actividad hepatotóxica se utilizó un modelo experimental murino empleando ratones Balb/c. En este modelo se utilizaron ratones hembras Balb/c (H-2^d) de 6-8 semanas de edad que fueron inoculadas vía intramuscular (*im*) sobre el muslo de la extremidad posterior derecha con 200µL de la fracciones hexánicas a una concentración de 0.5mg/mL resuspendida en PBS. Los tratamientos se administraron cada tercer día, durante 20d, sumando un total de 5 inoculaciones (Tabla III).

Al terminar el periodo de incubación, los hígados de los ratones tratados con las fracciones y del control fueron cortados en piezas de 1cm³ aproximadamente y colocados en formol al 10%, después de 48h que estuvieron las piezas en formol se continuo con la técnica de deshidratación (Tabla IV).

Tabla IV. Técnica de deshidratación de tejidos	
Reactivo	Tiempo (h)
Alcohol etílico 80% I	1:30
Alcohol etílico 80% II	1:30
Alcohol etílico 96% I	1:30
Alcohol etílico 96% II	1:30
Alcohol etílico absoluto I	1:30
Alcohol etílico absoluto II	1:30
Xilol I	1:30
Xilol II*	1:30
Parafina I	1:30
Parafina II	1:30
Parafina III	1:30

*se debe parecer y sentir como plástico.

Los tejidos se incrustaron en parafina para su corte en el micrótopo a un espesor de 8µm, los cortes se pasaron a un baño de agua caliente 40°C, después se les coloca albúmina en el portaobjetos para recoger el corte y que este se fijara, se desparafinó

colocándolo en el horno durante 15 min a una temperatura de 50-60°C, y después se continuó con la tinción de hematoxilina y eosina (Tabla V).

Tabla V. Tinción con Hematoxilina y Eosina	
Reactivo	Tiempo
Xilol I	10 min
Xilol II	5 min
Alcohol absoluto	3 min
Alcohol 96 I	3 min
Alcohol 96 II	3 min
Agua de la llave	1 min
Hematoxilina de Harris	Determinar tiempo, sugerido 3 min
Agua de la llave	1 min
Ácido clorhídrico diluido	10 sumergidas
Agua de la llave	1:30 min
Agua amoniacal	10 sumergidas
Agua de la llave	1:30 min
Eosina	Determinar tiempo, sugerido 1:30 min
Alcohol 96% I	5 sumergidas
Alcohol 96% II	5 sumergidas
Alcohol absoluto	5 sumergidas
Xilol I	5 min
Xilol II	10 min
se monta en resina	

5.21. Evaluación de la actividad linfoproliferativa de las fracciones hexánicas con linfocitos residentes y activados

Se obtuvieron los linfocitos de timo y bazo y se realizaron lavados en PBS, el pellet de linfocitos de timo y bazo se disolvió en medio RPMI completo y se ajustaron a 1.25×10^7 y 1×10^7 células/mL respectivamente y se depositaron en alícuotas de $80 \mu\text{L}$ en placas de 96 pozos de fondo plano las cuales contenían cultivos por triplicado, donde previamente se les agregaron $100 \mu\text{L}$ del tratamiento ó $100 \mu\text{L}$ de medio RPMI completo (el cual sirvió como control) y se agregaron $20 \mu\text{L}$ del mitógeno Con-A a una concentración óptima de $2.4 \mu\text{g/mL}$ o $20 \mu\text{L}$ de medio (el cual sirvió como control no estimulado) obteniendo un volumen final de $200 \mu\text{L}$. Se incubaron por 44h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% aire y se adicionaron $20 \mu\text{L}$ a cada pozo de MTT a una concentración final de 0.5mg/mL y se incubó el cultivo por 4h; después se agregaron $80 \mu\text{L}$ de amortiguador de lisis celular (SDS al 20% en 50% de DMF) a todos los pozos y se incubaron por 16h (Gomez-Flores *et al.*, 2010). Posteriormente se leyeron las densidades ópticas resultantes de la solubilización del formazán a 570nm en un lector de microplacas (Figura 10).

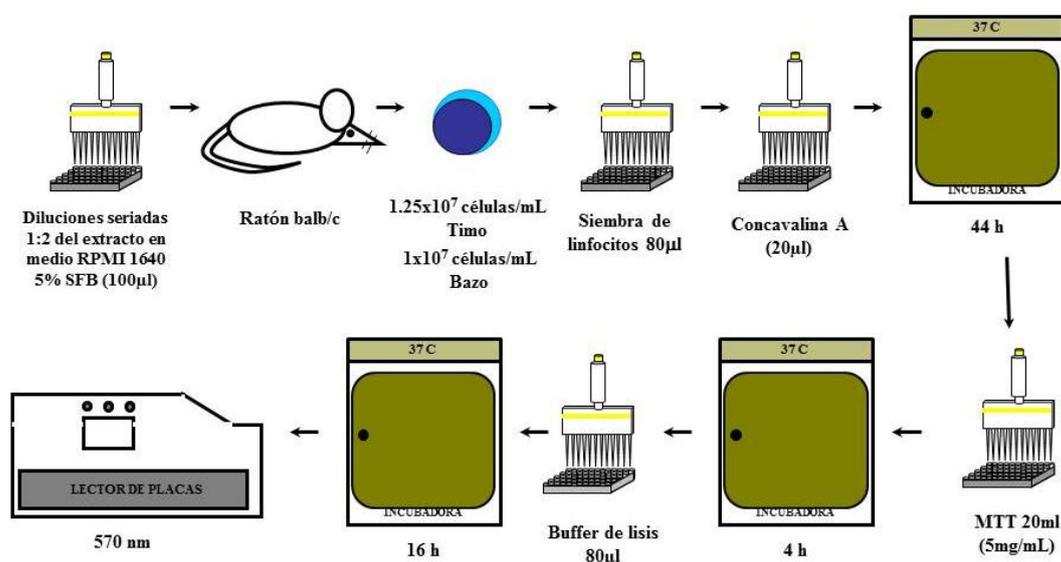


Figura 10. Método de linfoproliferación *in vitro*.

5.22. Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en dos pasos: el primero, fue la determinación de la distribución de los datos obtenidos para cada variable estudiada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; en el segundo, se realizó una comparación por análisis de varianza (ANOVA). Para los datos con una distribución normal predominante se empleó la prueba de una vía, para determinar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que constaba el experimento (control y tratamientos). En los casos que se encontró diferencia entre los grupos, se empleó la prueba de t de Student para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media \pm el error estándar del grupo control contra cada una de las concentraciones de los tratamientos.

6. RESULTADOS.

6.1 Obtención de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum*

Las fracciones hexánicas fueron proporcionadas por el Dr. Ramiro Quintanilla Licea del Laboratorio de Fitoquímica de esta facultad, obtenidas en base al siguiente procedimiento (Gomez-Flores *et al.*, 2012).

Se utilizaron 440 g de hojas de *G. glutinosum* secas y molidas para realizar extracción Soxhlet durante 40 h con 2.2 L de hexano. Después del proceso de extracción se filtró y se eliminó el solvente por medio de un rotavapor “Büchi” R-3000 y al final se obtuvo 64.5 g (14.65 %) del extracto hexánico.

Los 64.45g del extracto hexánico fueron sometidos a 7 procesos de cromatografía en columna, cada uno con 120 g de sílica gel 60–200 mallas, “J. T. Baker” y 9-10 g de muestra; la elución se realizó mediante un gradiente de hexano–cloroformo–acetato de etilo en porciones de 400 mL y al finalizar con 800 mL de metanol para arrastrar los compuestos más polares que pudieran haber quedado retenidos en la columna. Se colectaron fracciones de 10 mL obteniéndose para cada columna 920 fracciones las cuales fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina y se determinó mezclar aquellas que presentaran compuestos con R_f similares. Se obtuvieron cuatro grupos de fracciones denominadas SC y se determinó su peso (Tabla VI, datos proporcionados por Dr. Ramiro Quintanilla Licea).

Tabla VI. Rendimiento de la separación por cromatografía en columna del extracto hexánico de *G. glutinosum*.

Fracción	Peso (g)	Porcentaje (%)
SC1	7.27	11.26
SC2	3.91	6.06
SC3	6.61	10.24
SC4	30.01	46.51

Se sometieron 1.75 g de la fracción SC1 a una cromatografía en columna con 20g de sílica gel 60–200 Mallas, “J. T. Baker”; la elución se realizó mediante un gradiente de hexano–cloroformo–acetato de etilo en porciones de 50 mL. Se colectaron fracciones de 10 mL, obteniéndose 65 fracciones las cuales fueron analizadas mediante

cromatografía en capa fina para determinar las fracciones que serían mezcladas en la formación de fracciones colectivas FC.

Los grupos de fracciones que se mezclaron presentaron los siguientes pesos (se muestran las fracciones individuales de la columna que fueron mezcladas) (Tabla VII, datos proporcionados por Dr. Ramiro Quintanilla Licea).

Tabla VII. Rendimiento de la separación de SC1 por cromatografía en columna.			
Fracción	Fracciones mezcladas	Peso (mg)	Por ciento (%)
FC1	1	224	12.8
FC2	2–5	180	10.3
FC3	6–12	273	15.6
FC4	13–17	110	6.3
FC5	18–20	79	4.5
FC6	21–27	122	6.9
FC7	28–37	142	8.1
FC8	38–65	311	17.8

A continuación se realizó cromatografía en capa fina de las ocho fracciones colectivas obtenidas para revisar la distribución de los compuestos presentes (Figura 11).

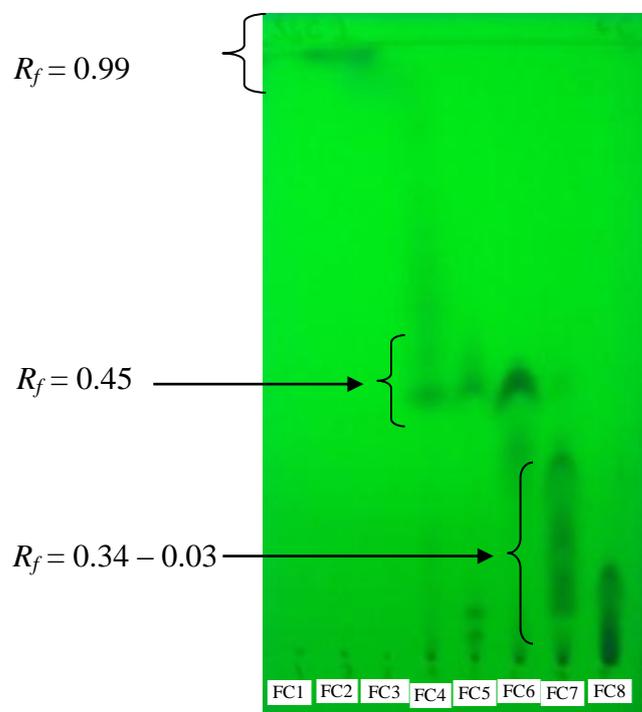


Figura 11. Cromatografía en capa fina (Eluyente: Hexano–Cloroformo 1:1; Revelador: Luz UV 254 nm) de las FC obtenidas del primer fraccionamiento por columna cromatográfica de la fracción SC1.

El análisis realizado nos permitió observar que las fracciones FC1, FC2 y FC3 presentan compuestos de polaridad muy baja ($R_f \approx 1.00$), las fracciones FC4, FC5 y FC6 presentan principalmente compuestos de polaridad media ($R_f = 0.45$) mientras que en las fracciones FC7 y FC8 se observan compuestos de polaridad más alta ($R_f \approx 0.35$).

6.2 Análisis de la actividad citotóxica de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre el crecimiento del linfoma L5178Y-R.

Para la evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* en contra del linfoma L5178Y-R, se empleó el método colorimétrico de MTT, descrito previamente (material y métodos), en el cual las células se sometieron a diluciones seriadas de la fracción y utilizando MTT a una concentración de 5mg/mL se determinó la viabilidad celular por medio de un lector de microplacas.

Por medio del análisis de los resultados se observó que seis de ocho fracciones hexánicas mostraron actividad citotóxica contra el linfoma L5178YR, la fracción 1 (FC1) inhibió significativamente ($p < 0.01$) el crecimiento de células de L5178Y-R a partir de la concentración de 15.6µg/mL en un 25%, mientras que en la siguiente concentración (31.2µg/mL) se observó una inhibición de 60% ($p < 0.01$), aumentando su citotoxicidad a las siguientes concentraciones y manteniendo su citotoxicidad en 65% ($p < 0.01$).

La FC3 mostró un efecto citotóxico significativo (35%) a partir de la concentración de 15.62µg/mL aumentando su citotoxicidad a 65% en las siguientes concentraciones.

La FC4 mostró efecto citotóxico significativo ($p < 0.001$) de un 9% a partir de la concentración de 15.62µg/mL aumentando su efecto hasta el 60% (Figura 11).

La FC5 mostró efecto citotóxico significativo del 60% ($p<0.01$) a una concentración de 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentando su citotoxicidad al 70% en las demás concentraciones.

La FC6 mostró un efecto citotóxico del 35% ($p<0.01$) con la dosis de 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentando su efecto hasta al 65% ($p<0.01$) en las demás concentraciones.

La FC7 mostró actividad citotóxica (70%) a partir de la concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p<0.05$) (Figura 12).

La FC2 y FC8 no mostraron actividad citotóxica en contra del crecimiento de células de L5178Y-R (datos no mostrados).

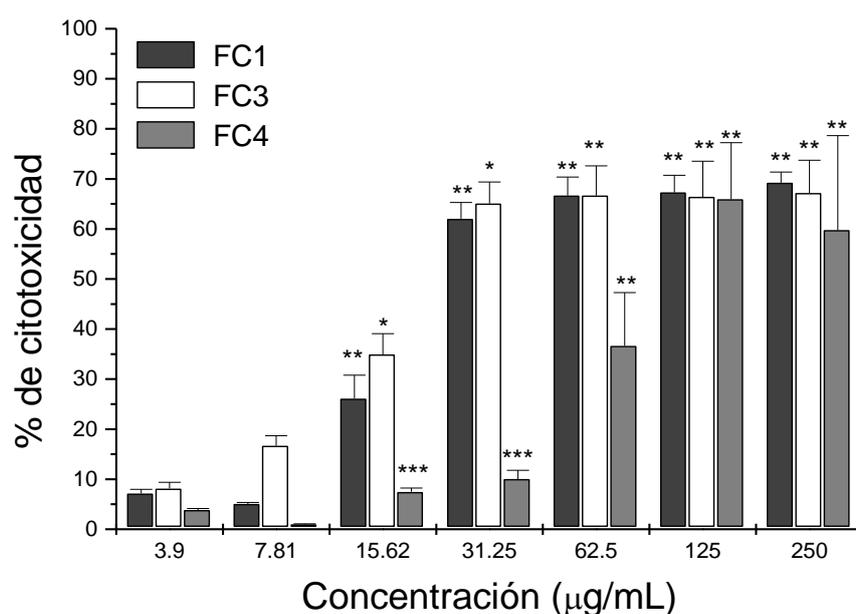


Figura 12. Efecto citotóxico de las fracciones hexánicas FC1, FC3 y FC4 de *G. glutinosum* contra la línea linfóide L5178Y-R. Las células del linfoma se trataron con las fracciones por 48h, transcurrido ese periodo se midió su viabilidad con la técnica colorimétrica de MTT, comparando contra un control sin tratar. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ comparado con el control sin tratar.

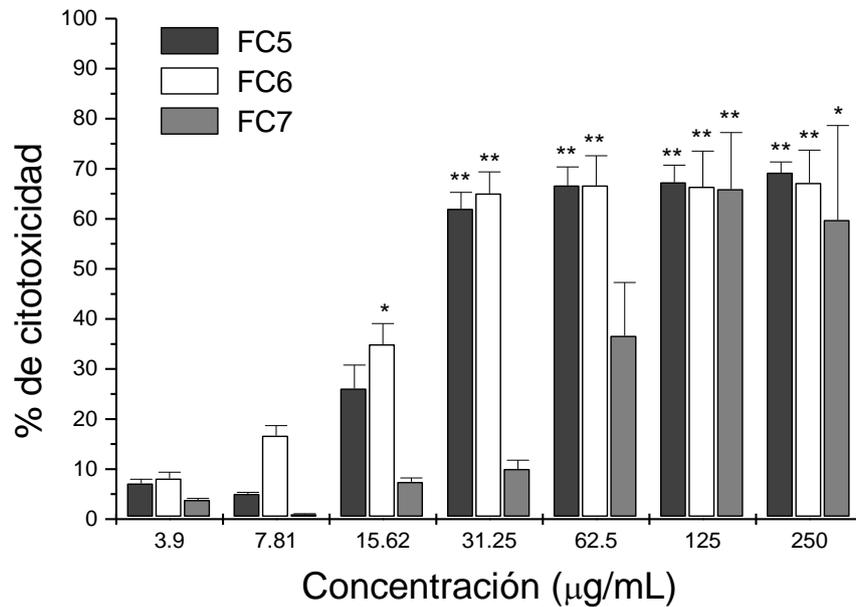


Figura 13. Efecto citotóxico de las fracciones hexánicas FC5, FC6 y FC7 de *G. glutinosum* contra la línea linfóide L5178Y-R. Las células del linfoma se trataron con las fracciones por 48h, transcurrido ese periodo se midió su viabilidad con la técnica colorimétrica de MTT, comparando contra un control sin tratar. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

6.3 Análisis de la mortalidad celular inducida por las fracciones hexánicas de *G. glutinosum*

Se analizó si las fracciones inducían la fragmentación del ADN como consecuencia de la muerte celular inducida por apoptosis de células L5178Y-R tratadas con las fracciones.

Los resultados muestran que a partir de las 6h las células son inducidas por apoptosis ya que en el gel se observaron las características bandas en forma de escalera que se refieren a la fragmentación de ADN (Figura 14). Este mismo patrón se mantuvo en las siguientes horas (Figura 15).

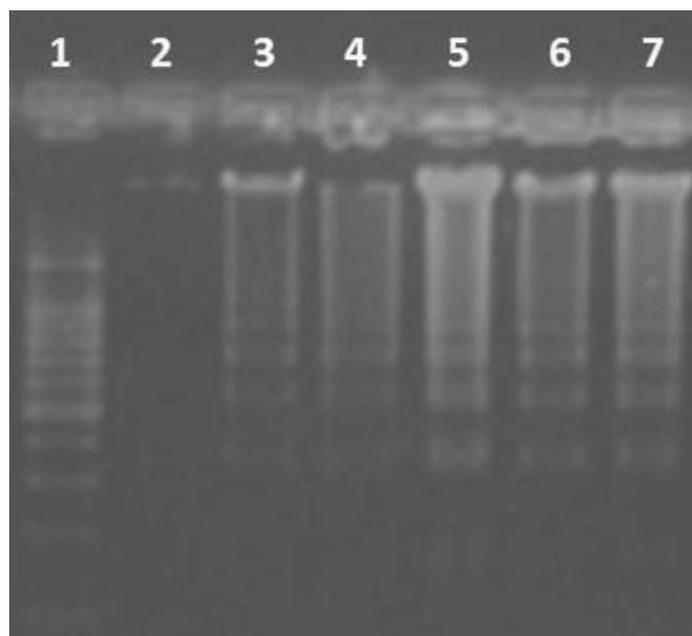


Figura 14. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con las fracciones hexánicas. Patrón característico de la fragmentación de ADN nuclear debido a la muerte celular programada detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% a partir de ADN de células de L5178Y-R tratadas durante 6h en presencia de varias fracciones hexánicas, como control positivo se utilizó actinomicina D y como control negativo, el medio de cultivo. Carril 1: Marcador de peso molecular (100pb). Carril 2: Control negativo de células sin tratar. Carril 3: Control positivo para apoptosis con Act D a una concentración de 2.4µg/mL. Carril 4: Células tratadas con la fracción hexánica 1 a una concentración de 250 µg/mL durante 6h. Carril 5: Células tratadas con la fracción hexánica 3 a una concentración de 250 µg/mL durante 6h. Carril 6: Células tratadas con la fracción hexánica 4 a una concentración de 250 µg/mL durante 6h. Carril 7: Células tratadas con la fracción hexánica 5 a una concentración de 250 µg/mL durante 6h.

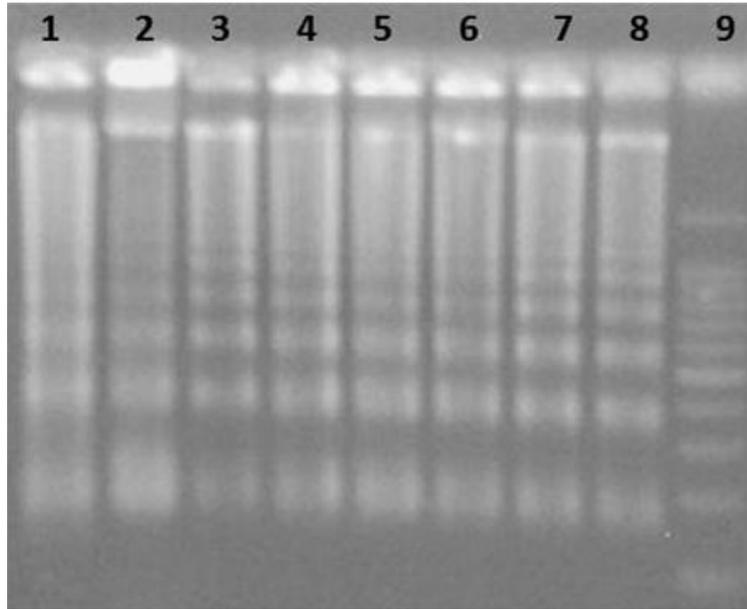


Figura 15. Análisis de la fragmentación de ADN de células L5178Y-R tratadas con las fracciones hexánicas. Patrón característico de la fragmentación de ADN nuclear debido a la muerte celular programada detectado por electroforesis en gel de agarosa 2% a partir de ADN de células de L5178Y-R tratadas durante 24 h en presencia de varias fracciones hexánicas, como control positivo se utilizó actinomicina D y como control negativo el medio de cultivo. Carril 1: Control positivo para apoptosis con Act D a una concentración de 2.4µg/mL Carril 2: Control negativo de células sin tratar. Carril 3: Células tratadas con la fracción hexánica 1 a una concentración de 250 µg/mL durante 24h. Carril 4: Células tratadas con la fracción hexánica 3 a una concentración de 250 µg/mL durante 24h. Carril 5: Células tratadas con la fracción hexánica 4 a una concentración de 250 µg/mL durante 24h. Carril 6: Células tratadas con la fracción hexánica 5 a una concentración de 250 µg/mL durante 24h. Carril 7: Células tratadas con la fracción hexánica 6 a una concentración de 250 µg/mL durante 24h. Carril 8: Células tratadas con la fracción hexánica 7 a una concentración de 250 µg/mL durante 24h. Carril 9: Marcador de peso molecular (100pb).

6.4 Análisis de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre la proliferación de linfocitos de timo y bazo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno

Para la evaluación de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre la proliferación de células de timo y bazo, se empleó el método colorimétrico de MTT, en el cual las células se sometieron a diluciones seriadas del extracto, utilizando un mitógeno estimulante (Con A). Los resultados que a continuación se presentan se obtuvieron siguiendo esta metodología de medición de viabilidad en base a la intensidad en la coloración como respuesta a la respiración celular.

6.4.1 Análisis de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre la proliferación de linfocitos de timo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

Al analizar la actividad de los extractos sobre la proliferación de los linfocitos de timo, los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos con las fracciones en contra los linfocitos de timo en ausencia y presencia del mitógeno (Tabla VIII) (Figuras 16, 17 y 18).

Tabla VIII. Efecto de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre la proliferación de linfocitos de timo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Con A ($\mu\text{g/mL}$)	FC1 I.P. ($\mu\text{g/mL}$)	FC3 I.P. ($\mu\text{g/mL}$)	FC4 I.P. ($\mu\text{g/mL}$)	FC5 I.P. ($\mu\text{g/mL}$)	FC6 I.P. ($\mu\text{g/mL}$)	FC7 I.P. ($\mu\text{g/mL}$)
3.9	----	0.94 \pm 0.12	0.96 \pm 0.13	0.96 \pm 0.11	0.84 \pm 0.07	1.00 \pm 0.14	0.99 \pm 0.10
	2.4	1.01 \pm 0.15	0.94 \pm 0.12	0.95 \pm 0.1	0.95 \pm 0.1*	0.95 \pm 0.10*	0.95 \pm 0.1
7.81	----	0.93 \pm 0.11	0.94 \pm 0.12	0.96 \pm 0.12	0.87 \pm 0.11	1.05 \pm 0.15	1.00 \pm 0.08
	2.4	0.92 \pm 0.10	0.96 \pm 0.13	0.91 \pm 0.09	0.95 \pm 0.09**	0.95 \pm 0.09**	1.0 \pm 0.13
15.62	----	0.90 \pm 0.11*	0.93 \pm 0.13	0.92 \pm 0.10	0.82 \pm 0.05	0.98 \pm 0.12	1.00 \pm 0.1
	2.4	0.92 \pm 0.10	0.94 \pm 0.13	0.89 \pm 0.09	0.89 \pm 0.09**	0.89 \pm 0.09	0.96 \pm 0.09
31.25	----	0.85 \pm 0.10	0.96 \pm 0.15	0.88 \pm 0.10	0.80 \pm 0.07	1.00 \pm 0.12	1.05 \pm 0.11
	2.4	0.88 \pm 0.09	0.93 \pm 0.12	0.82 \pm 0.09	0.97 \pm 0.13	0.97 \pm 0.13	0.97 \pm 0.09
62.5	----	0.77 \pm 0.11	0.89 \pm 0.18	0.79 \pm 0.09	0.80 \pm 0.09	0.99 \pm 0.13	0.97 \pm 0.09
	2.4	0.78 \pm 0.10	0.85 \pm 0.11	0.77 \pm 0.09	0.86 \pm 0.06*	0.86 \pm 0.06*	0.93 \pm 0.09
125	----	0.70 \pm 0.05	0.79 \pm 0.18	0.72 \pm 0.06	0.70 \pm 0.11	0.87 \pm 0.18	0.89 \pm 0.12
	2.4	0.66 \pm 0.10	0.81 \pm 0.17	0.72 \pm 0.08	0.80 \pm 0.09	0.80 \pm 0.09	0.87 \pm 0.08
250	----	0.63 \pm 0.04*	0.62 \pm 0.03*	0.67 \pm 0.03	0.64 \pm 0.03	0.66 \pm 0.05	0.76 \pm 0.08
	2.4	0.65 \pm 0.03*	0.63 \pm 0.05*	0.75 \pm 0.09	0.83 \pm 0.17	0.83 \pm 0.17	0.78 \pm 0.09

La densidad óptica del control no tratado fue de 0.7212 \pm 0.0246. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones por cada experimento.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

I. P. Índice de proliferación

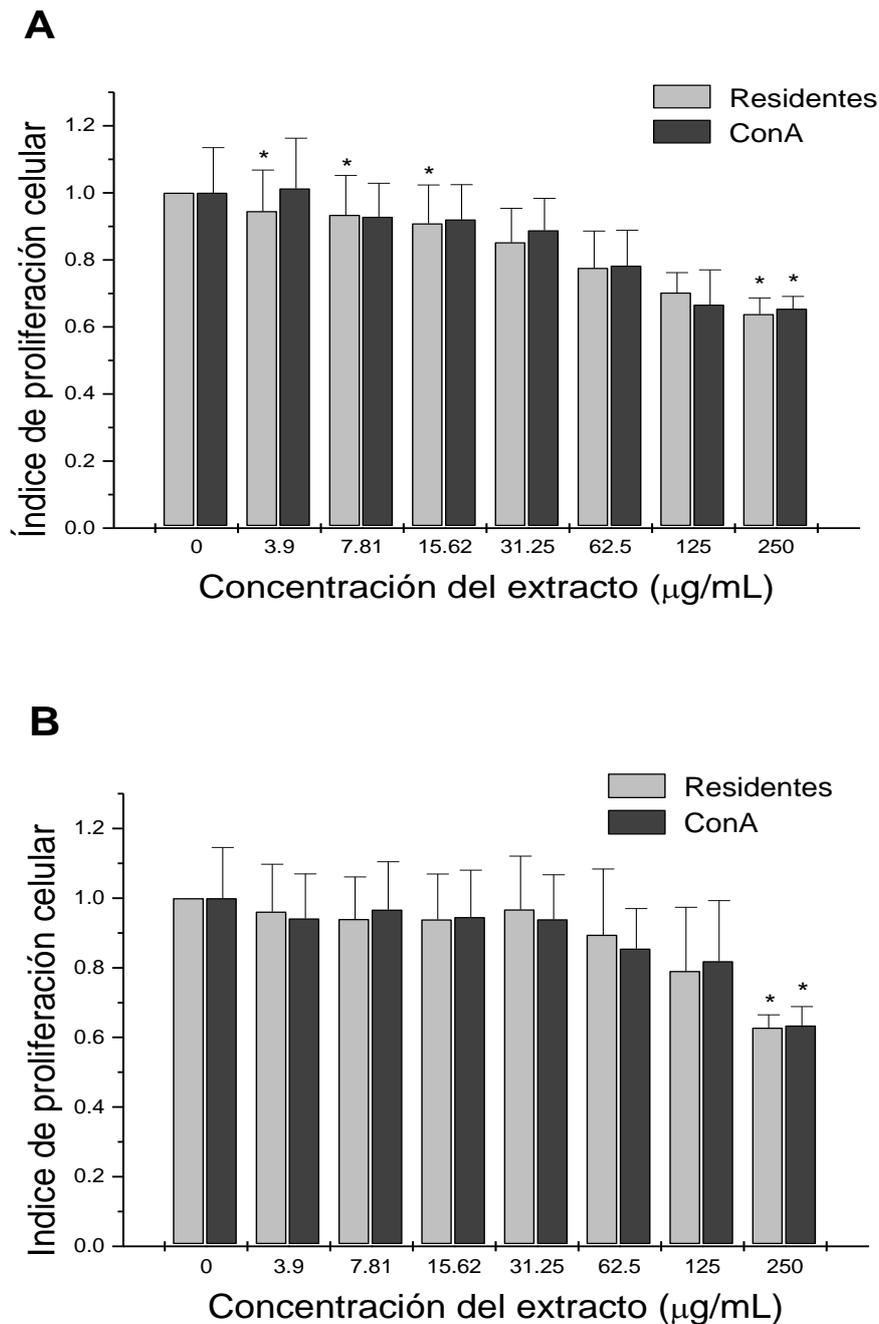


Figura 16. Efecto de las fracciones hexánicas FC1 (A) y FC3 (B) de *G. glutinosum* sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno. Las fracciones hexánicas se probaron a diferentes concentraciones (3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 500µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de timo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

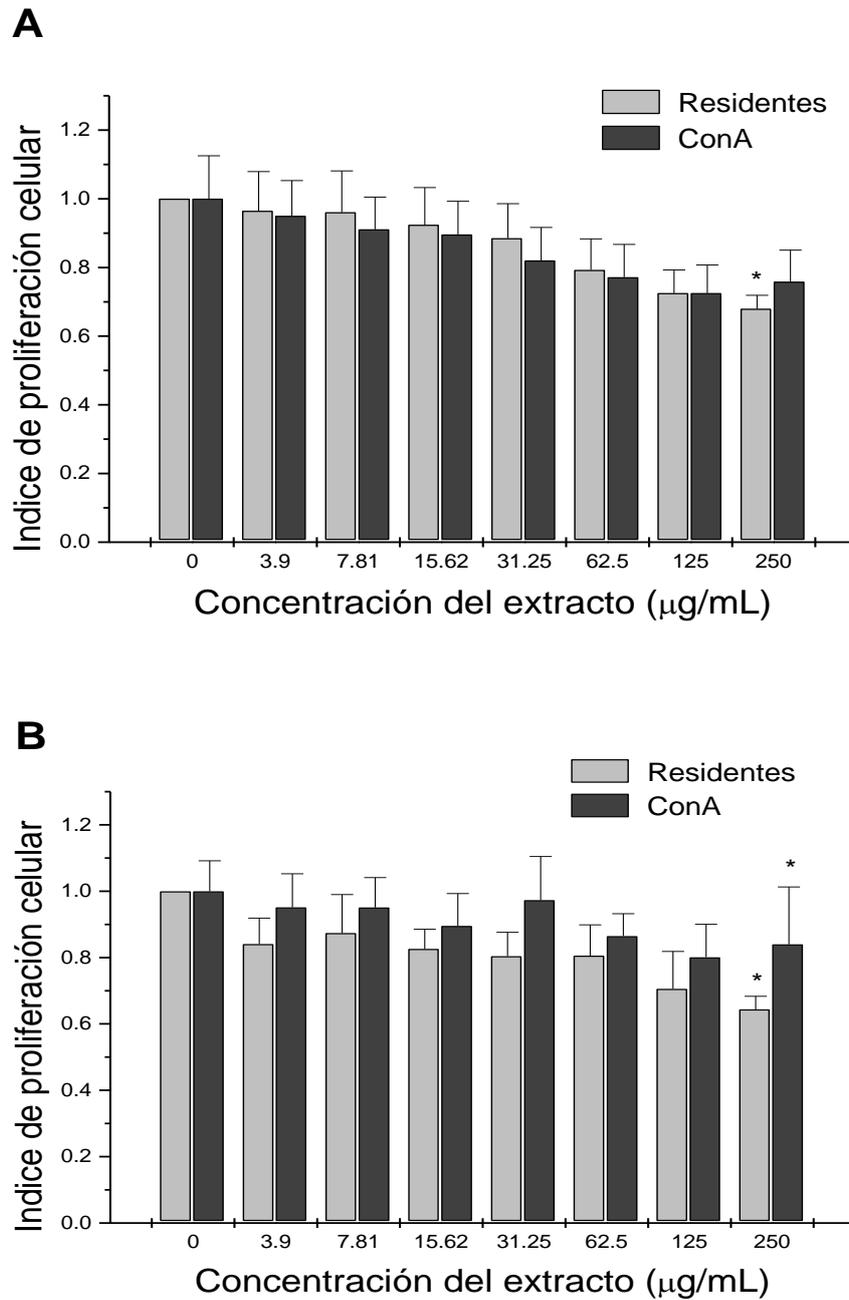


Figura 17. Efecto de las fracciones hexánicas FC4 (A) y FC5 (B) de *G. glutinosum* sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno. Las fracciones hexánicas se probaron a diferentes concentraciones (3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 500µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de timo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

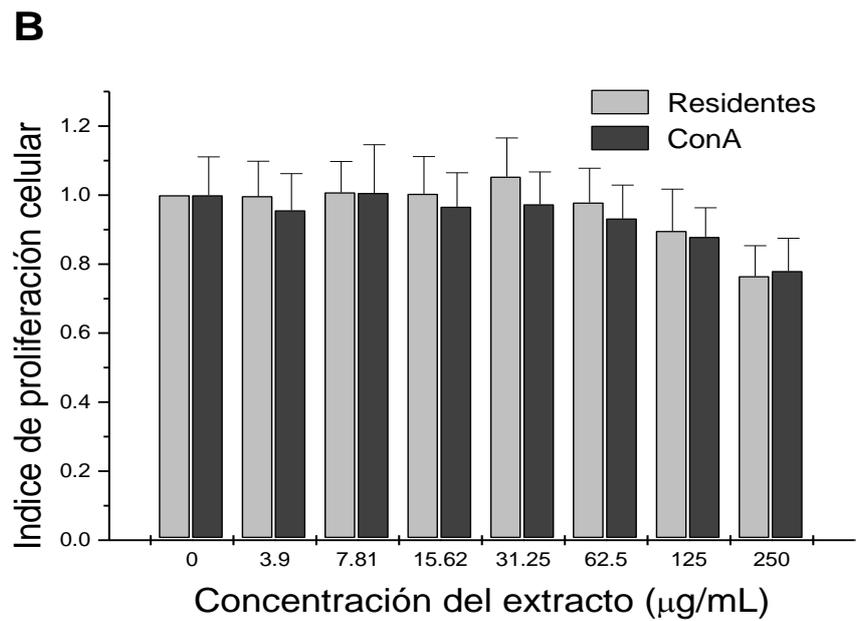
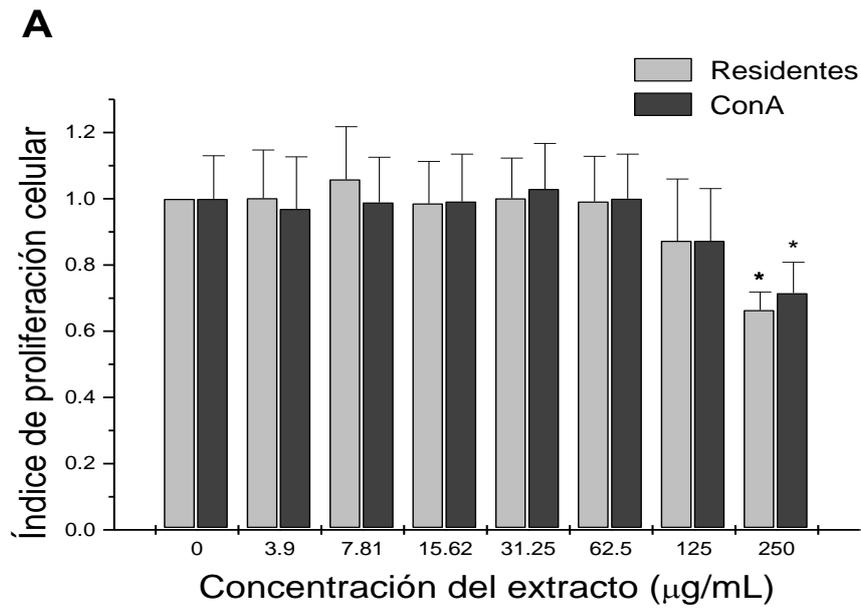


Figura 18. Efecto de las fracciones hexánicas FC6 (A) y FC7 (B) de *G. glutinosum* sobre la linfoproliferación de células de timo en presencia y ausencia del mitógeno. Las fracciones hexánicas se probaron a diferentes concentraciones (3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 500µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de timo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

6.4.2 Análisis de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre la proliferación de linfocitos de bazo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

Al analizar la actividad de los extractos sobre la proliferación de los linfocitos de bazo, los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos con las fracciones (Tabla IX), no se observan un efecto citotóxico contra los linfocitos de timo en ausencia y presencia del mitógeno (Figuras 19, 20 y 21).

Tabla IX. Efecto de la actividad inmunomoduladora de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre la proliferación de linfocitos de bazo *in vitro* en ausencia y presencia de mitógeno.

Concentración (µg/mL)	Con A (µg/mL)	FC1 (µg/mL) I.P.	FC3 (µg/mL) I.P.	FC4 (µg/mL) I.P.	FC5 (µg/mL) I.P.	FC6 (µg/mL) I.P.	FC7 (µg/mL) I.P.
3.9	-----	0.99±0.10	1.02±0.05	0.98±0.09	0.90±0.12	1.0±0.18	0.99±0.18
	2.4	0.99±0.05	0.96±0.09	0.91±0.03	0.91±0.15	0.95±0.12	0.98±0.17
7.81	-----	0.96±0.10	0.97±0.07	0.93±0.08	0.86±0.13	1.0±0.17	0.98±0.19
	2.4	1.0±0.8	0.97±0.06	0.85±0.16	0.85±0.15	1.05±0.15	1.0±0.15
15.62	-----	1.0±0.12	1.04±0.12	0.98±0.06	0.91±0.16	1.0±0.16	1.02±0.21
	2.4	1.02±0.09	0.96±0.07	0.92±0.13	0.88±0.15	1.01±0.17	0.97±0.14
31.25	-----	1.0±0.12	0.98±0.08	0.98±0.06	0.95±0.19	0.99±0.15	1.06±0.18
	2.4	1.04±0.16	0.95±0.08	0.91±0.20	0.87±0.19	1.09±0.16	0.92±0.14
62.5	-----	0.94±0.9	1.06±0.10	0.97±0.04	0.94±0.18	0.97±0.16	1.04±0.17
	2.4	1.03±0.9	0.92±0.08	0.95±0.11	0.89±0.13	1.02±0.18	0.94±0.12
125	-----	0.80±0.14	0.88±0.12	0.88±0.05	0.88±0.14	0.91±0.18	0.93±0.16
	2.4	0.91±0.11	0.87±0.06	0.82±0.11	0.91±0.16	0.89±0.19	0.91±0.14
250	-----	0.51±0.09	0.62±0.13	0.50±0.12	0.75±0.20	0.71±0.18	0.75±0.15
	2.4	0.56±0.10	0.60±0.14	0.68±0.14	0.81±0.19	0.79±0.19	0.83±0.15

La densidad óptica del control no tratado fue de 12 ± 0.0 . Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones por cada experimento.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

I. P. Índice de proliferación

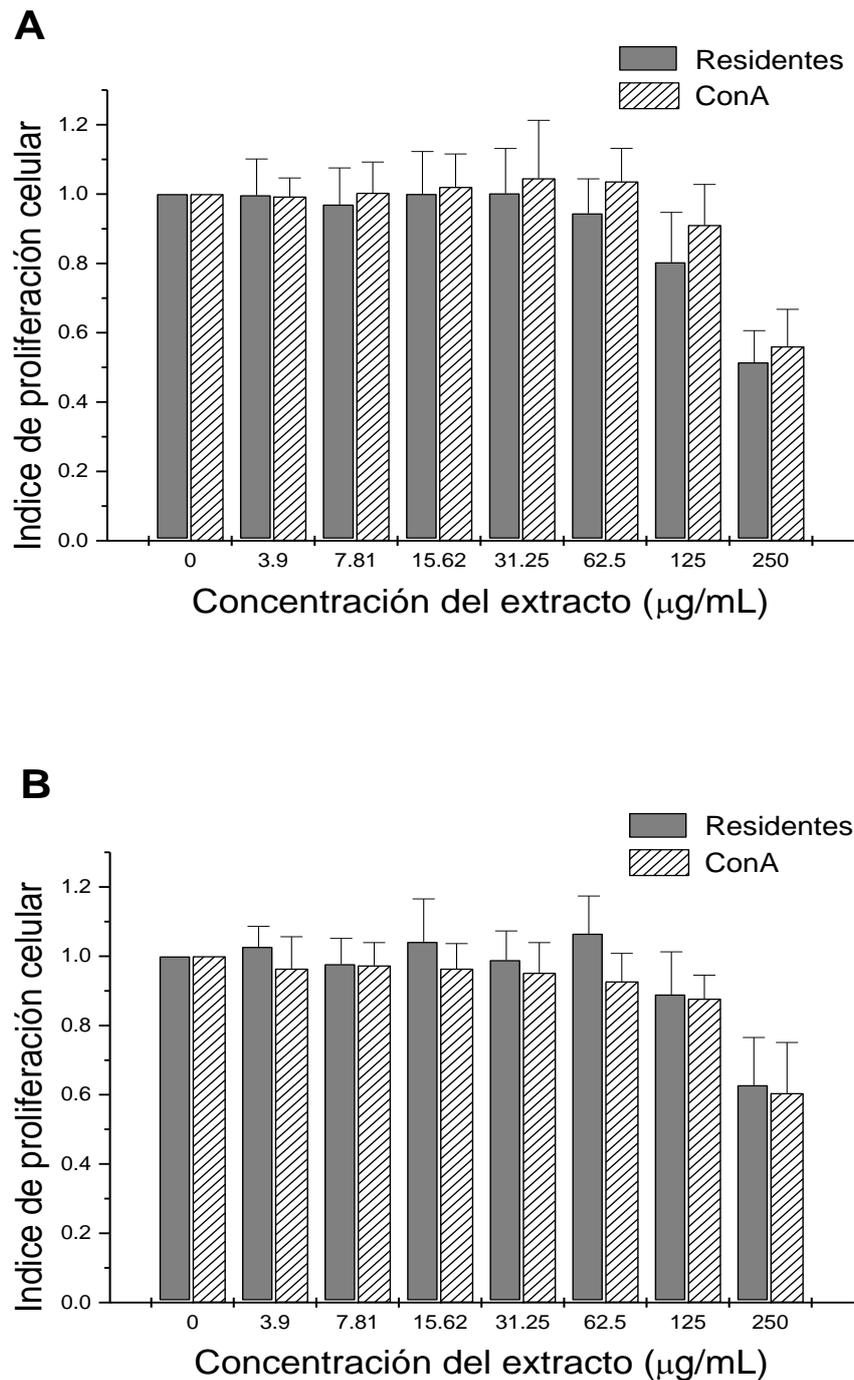


Figura 19. Efecto de las fracciones hexánicas FC1 (A) y FC3 (B) de *G. glutinosum* sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia del mitógeno. Las fracciones hexánicas se probaron a diferentes concentraciones (3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de bazo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

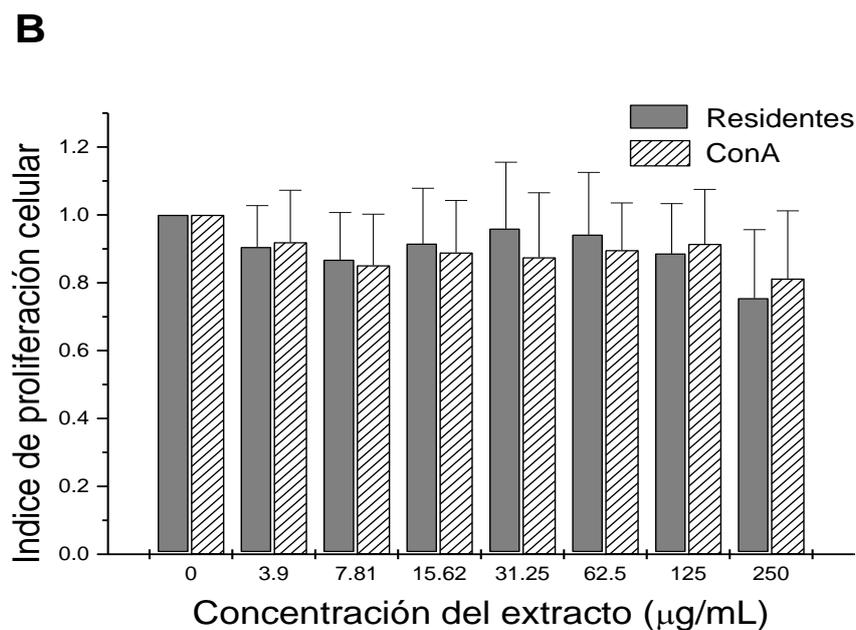
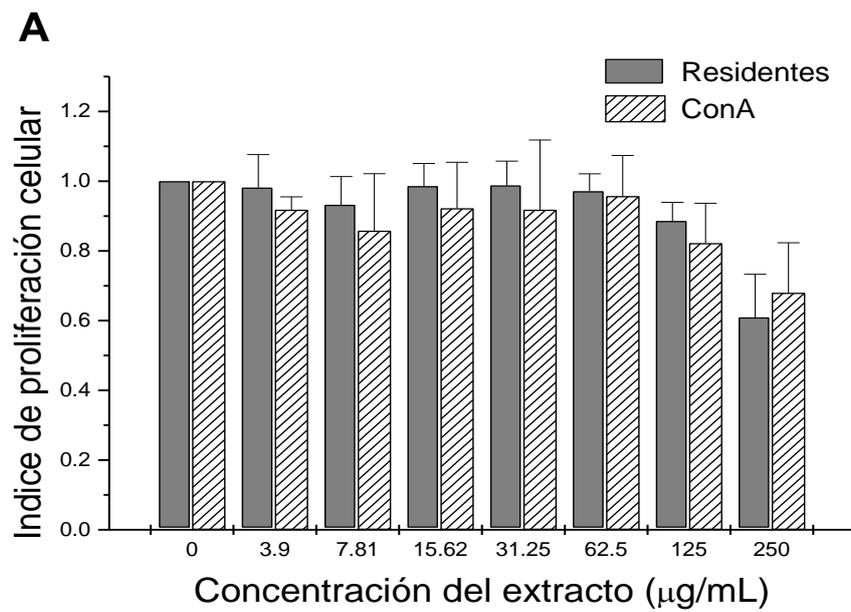


Figura 20. Efecto de las fracciones hexánicas FC4 (A) y FC5 (B) de *G. glutinosum* sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia del mitógeno. Las fracciones hexánicas se probaron a diferentes concentraciones (3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de bazo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

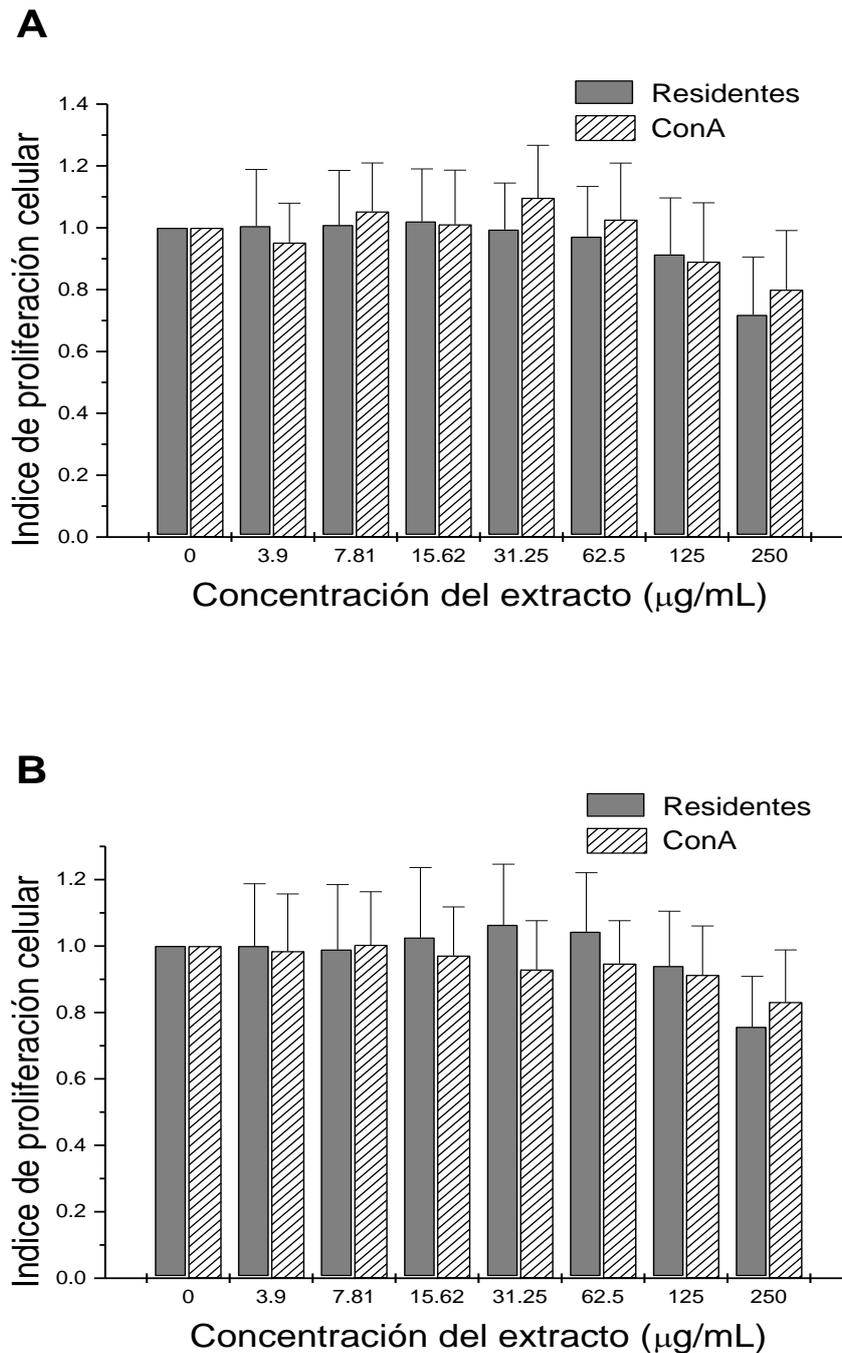


Figura 21. Efecto de las fracciones hexánicas FC6 (A) y FC7 (B) de *G. glutinosum* sobre la linfoproliferación de células de bazo en presencia y ausencia del mitógeno. Las fracciones hexánicas se probaron a diferentes concentraciones (3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 500µg/mL) sobre la viabilidad y actividad proliferativa de linfocitos de bazo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

6.5. Análisis de la actividad antitumoral y hepatotóxica *in vivo* de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* sobre el linfoma murino L5178Y-R

De acuerdo a la actividad observada en las ensayos *in vitro* se seleccionaron las FC6 y FC7 como tratamientos para analizar su actividad *in vivo* y hepatotóxica. Para la evaluación de la actividad antitumoral de las FC6 y FC7 se utilizaron 5 ratones hembras Balb/c de 6-8 semanas por cada grupo, las cuales las les indujo el tumor y al cabo de una semana de la formación del tumor (aprox. 7días), se administraron los tratamientos tal y como se describió anteriormente.

6.5.1. Efecto de las FC6 y FC7 sobre el crecimiento tumoral de ratones

De acuerdo al análisis de los resultados, a los siete días del trasplante del linfoma, se observó que el volumen tumoral, entre los grupos no fue significativamente diferente, tampoco el peso inicial de los ratones de los diferentes grupos fue diferente significativamente, ni el peso de los ratones a los siete días posteriores al trasplante del linfoma, por lo que se indica que los ratones iniciaron el tratamiento en condiciones similares.

El volumen tumoral se analizó utilizando el índice de crecimiento tumoral donde se toma como base el volumen de este de cada grupo en el día siete posterior al trasplante del tumor, que equivale al día de inicio de los tratamientos (Tabla X).

Los ratones del grupo IV, fueron tratados con la FC6 inoculados vía *im* (0.5mg/kg) en la pierna posterior derecha, mostraron un IC tumoral de 1, 5.64, 6.06, 6.28 y 6.32 respectivamente a los días 7, 10, 13, 17 y 20 posteriores de la inoculación del tumor, en donde no se observó reducción del IC tumoral ($p < 0.01$) (Tabla X).

En los ratones del grupo V, que fueron tratados con la FC7 inoculados vía *im* (0.5mg/kg) en la pierna posterior derecha, mostraron un IC tumoral de 1, 6.59, 7.17, 8.10 y 7.20, en los días 7, 10, 13, 17 y 20 posteriores al trasplante, observándose una reducción de IC en el último día de tratamiento ($p < 0.05$) (Tabla X).

El grupo III fue el control positivo, para lo cual se trató a los ratones con la droga vincristina, la cual fue inoculada a la concentración recomendada (0.05mg/kg) por la vía *iv*, este tratamiento mostró valores de crecimiento tumoral significativamente menores ($p < 0.05$) tras los días 13 y 20 posteriores al trasplante de las células tumorales. Los valores de IC tumoral 1, 6.34, 7.54, 8.13 y 7.73 a los días 7, 10, 13, 17 y 20 respectivamente (Tabla X).

El grupo VI fue tratado con el vehículo, inoculado vía *im*, presento valores de IC tumoral de 1, 6.09, 7.66, 6.25 y 6.71 tras los días 7, 10, 13, 17 y 20 posteriores al trasplante del linfoma respectivamente, los valores no presentan diferencia significativa con respecto al IC del grupo control no tratado (Tabla X).

Los valores de IC tumoral obtenidos del grupo II, fueron de 1, 5.83, 6.35, 6.73 y 6.83 para los días 7, 10, 13, 17 y 20 respectivamente posteriores al trasplante (Tabla X). Este grupo correspondió al control de crecimiento tumoral que fue inoculado con el linfoma pero no recibió tratamiento alguno.

A los grupos sin crecimiento tumoral que se les administraron las FC6 y FC7 vía *im* no presentaron ningún signo de inflamación en la zona de la inoculación, tampoco se les observó necrosis o signos de toxicidad. De este grupo se extrajo el hígado para evaluar la toxicidad hepática.

Tabla X. Efecto de las fracciones hexánicas sobre el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>						
(volumen tumoral mm3)						
Grupo	E^a	Día 7^c	Día 10	Día 13	Día 17	Día 20
I. Control (ratones sanos)	E1	122.02	113.00	117.51	115.25	116.38
	E2	116.68	96.43	86.18	89.22	80.28
	E3	121.13	122.97	106.17	128.74	147.62
	IC^b	1.0	0.92±0.06	0.96±0.07	0.92±0.23	0.95±0.4
II. Vincristina (0.05mg/kg)	E1	337.64	726.62	741.18	865.22	931.14
	E2	680.73	1070.38	1372.62	1451.54	1254.91
	E3	282.52	487.51	600.01	607.98	597.92
	IC^b	1.0	6.34±1.41*	7.54±1.98**	8.13±2.08**	7.73±1.58*
III. FC6 (0.5mg/kg)	E1	369.41	608.16	638.16	675.28	654.36
	E2	680.73	847.96	855.67	813.28	691.89
	E3	282.52	575.97	687.66	772.47	928.06
	IC^b	1.0	5.64±0.71*	6.06±0.54*	6.28±0.34*	6.32±0.71
IV. FC7 (0.5mg/kg)	E1	422.98	645.98	605.47	638.75	656.08
	E2	943.01	1070.67	1151.16	1413.49	1035.18
	E3	260.58	655.33	825.46	863.62	900.32
	IC^b	1.0	6.59±1.16*	7.17±1.32	8.10±1.91*	7.20±0.92
V. Vehículo	E1	465.17	727.83	941.04	766.21	841.72
	E2	686.57	856.36	1037.73	607.28	580.40
	E3	257.34	609.62	779.28	876.43	994.82
	IC^b	1.0	6.09±0.59*	7.66±0.62**	6.25±0.65	6.71±1.0

^a Representan la media del volumen tumoral mm3 de un ensayo con 5 ratones por cada grupo

^b El índice de crecimiento (IC) expresa el crecimiento observado en cada tratamiento con respecto al volumen del crecimiento tumoral de cada grupo en el día 7, posterior al trasplante del tumor, que equivale al día de inicio de los tratamientos. Los valores expresados representan la media ± el error estándar de tres experimentos.

^c Representa el volumen tumoral inicial, 7 días posteriores al trasplante del linfoma, el cual se le asignó el valor de 1 como IC.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ comparado con el control sin tratar.

6.5.2. Efecto de las FC6 y FC7 sobre la supervivencia de ratones con linfoma

La supervivencia de los ratones se monitoreó diariamente, al menos dos veces al día durante 60 días.

Entre los ratones del grupo V tratados con el vehículo, todos murieron en un promedio de 28 días, lo que es equivalente a un porcentaje de viabilidad del 0% (Figura 22, Tabla XI). Los ratones no mostraron zona de necrosis en el área del linfoma.

La supervivencia de los grupos III y IV, tratados con FC6 y FC7 respectivamente, se incrementó significativamente comparado contra el control con tumor sin tratar ($p < 0.05$) con un total de 7 ratones lo que equivale al 46.67% de viabilidad (Figura 22, Tabla XI). Los ratones no mostraron evidencia de algún daño tisular en el área del tumor.

Respecto al grupo II, control positivo tratado con vincristina sólo sobrevivieron 6 ratones de los 15 utilizados en el ensayo, que equivaldría al 40% de viabilidad, aunque el valor no fue significativo.

Tabla XI. Efecto de los tratamientos sobre la supervivencia de ratones con linfoma L5178Y-R

Número de ratones que sobrevivieron después de los 60 días de la inoculación del linfoma

Grupo	RI ^a	%PSI ^b	Exp 1	Exp 2	Exp 3	RF ^c	%PS ^d
I. Control	15	100	5	5	5	15	100
II. Vincristina (0.05 mg/kg)	15	100	2	1	3	6	40
III. FC6 (0.5 mg/kg)	15	100	3	4	0	7	46.67
IV. FC7 (0.5 mg/kg)	15	100	4	2	1	7	46.67
V. Vehículo	15	100	1	3	1	5	30

^a Representa el número de ratones iniciales por experimento (5 ratones por repetición)

^b Representa el porcentaje inicial de supervivencia en los 3 experimentos

^c Representa el número total de ratones de los 3 experimentos independientes, que sobrevivieron los 60 días que duró el experimento

^d Porcentaje de supervivencia de ratones tratados con FC y controles. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo (15 en total)

La viabilidad de los grupos III y IV, tratados con FC6 y FC7, se incrementó significativamente ($p < 0.05$) ya que se observó que en estos grupos sobrevivieron 7 ratones lo que equivale al 46.7% de viabilidad.

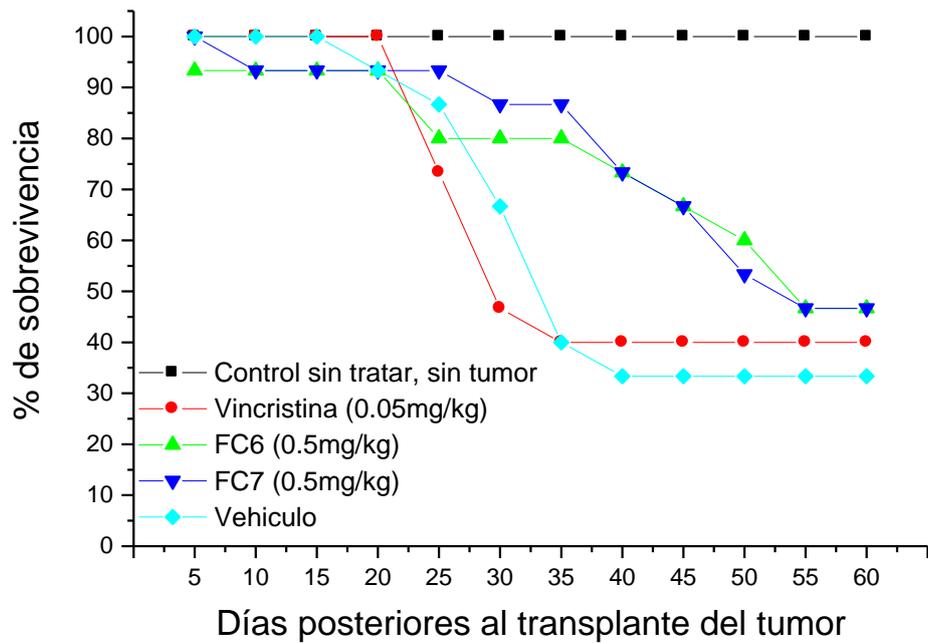


Figura 22. Efecto de los tratamientos sobre la sobrevivencia de ratones con linfoma. Ratones Balb/c hembras de 2 meses fueron inoculadas en el muslo de la extremidad posterior derecha vía *im*, con la línea celular L5178YR (5×10^6 células/mL). Después de 7 días de la inoculación, se formó un tumor aproximado de 100 cm^3 , los ratones fueron tratados cada 3er día durante 20 días con las fracciones FC6 y FC7 (0.5mg/kg *c/u*) *iv* en la vena caudal, con vincristina o con el vehículo. La sobrevivencia se evaluó diariamente durante 60 días.

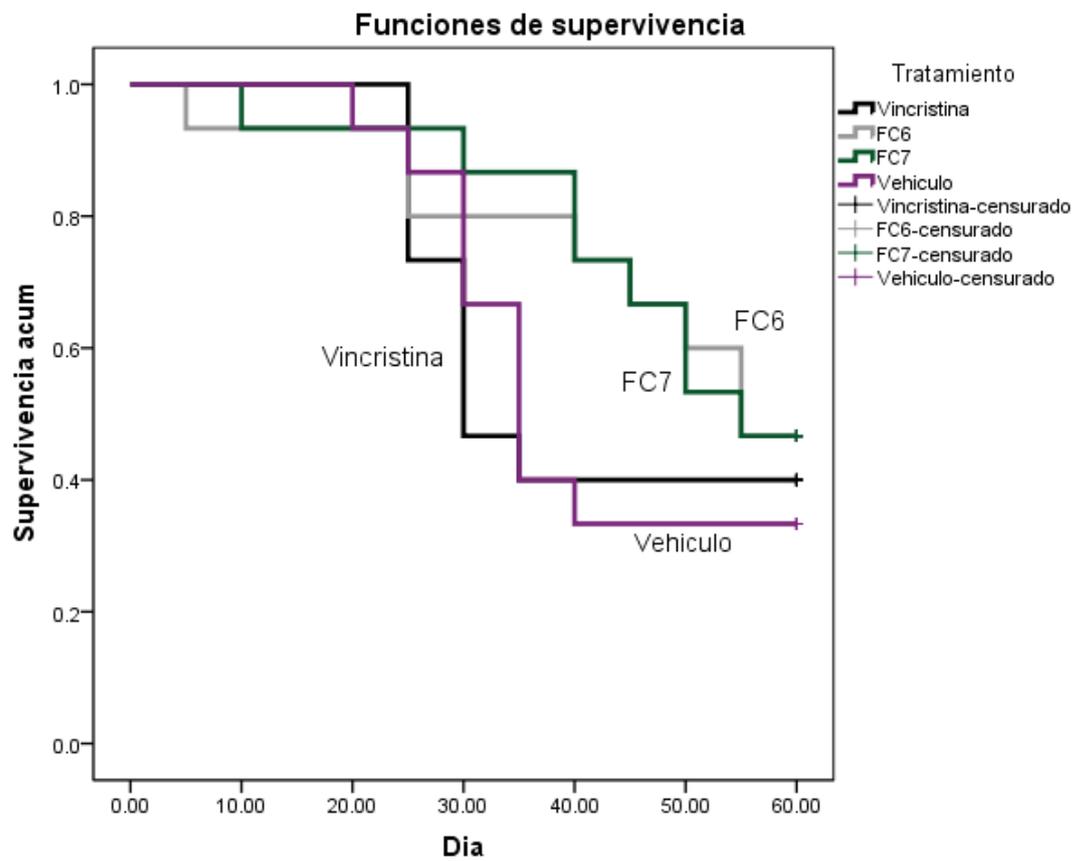


Figura 23. Probabilidad de supervivencia obtenida por el método Kaplan-Meier (ver apéndice) a lo largo del periodo de tratamiento (1-30 días) y el periodo de observación (31-60 días).

6.5.3. Análisis histológico de hígado

Para evaluar el grado de citotoxicidad de las FC6 y FC7, a ratones que solo fueron tratados con las fracciones cada 3er día durante 20 días sin la inducción del tumor, se les extrajo el hígado y se procesó por el método clásico de fijación de formalina neutra, deshidratación con alcoholes y transparentados con xilol, se les realizaron cortes histológicos teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina

Se realizaron los cortes histológicos a los tejidos de control sano y a los tratados con las FC6 y FC7. En los tres tejidos se observaron los hepatocitos con forma poligonal y con membrana celular clara. Los núcleos son esféricos con superficie regular y con variación ligera de tamaño de una célula a otra. Dentro de los núcleos se observaron gránulos de cromatina con uno o dos nucléolos. En el citoplasma de los hepatocitos se encontró almacenamiento de glucógeno (Figura 24). No se observó algún indicio de reparación celular, acumulo de grasa o necrosis celular en los hepatocitos (Figuras 25, 26 y 27). Dentro del tejido se puede ver la triada portal, la cual la constituye la vena, la arteria y el conducto biliar (Figura 28).

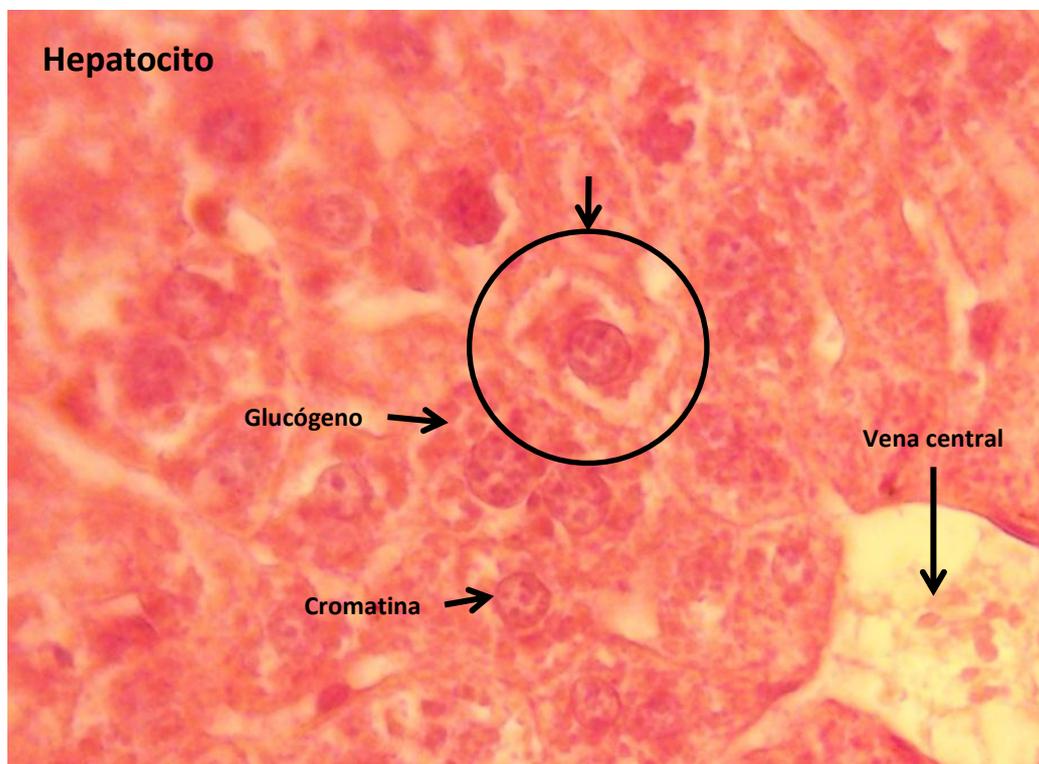


Figura 24. Corte histológico de hígado (100x), mostrando a detalle las características de los hepatocitos (círculo). Tinción con hematoxilina y eosina.

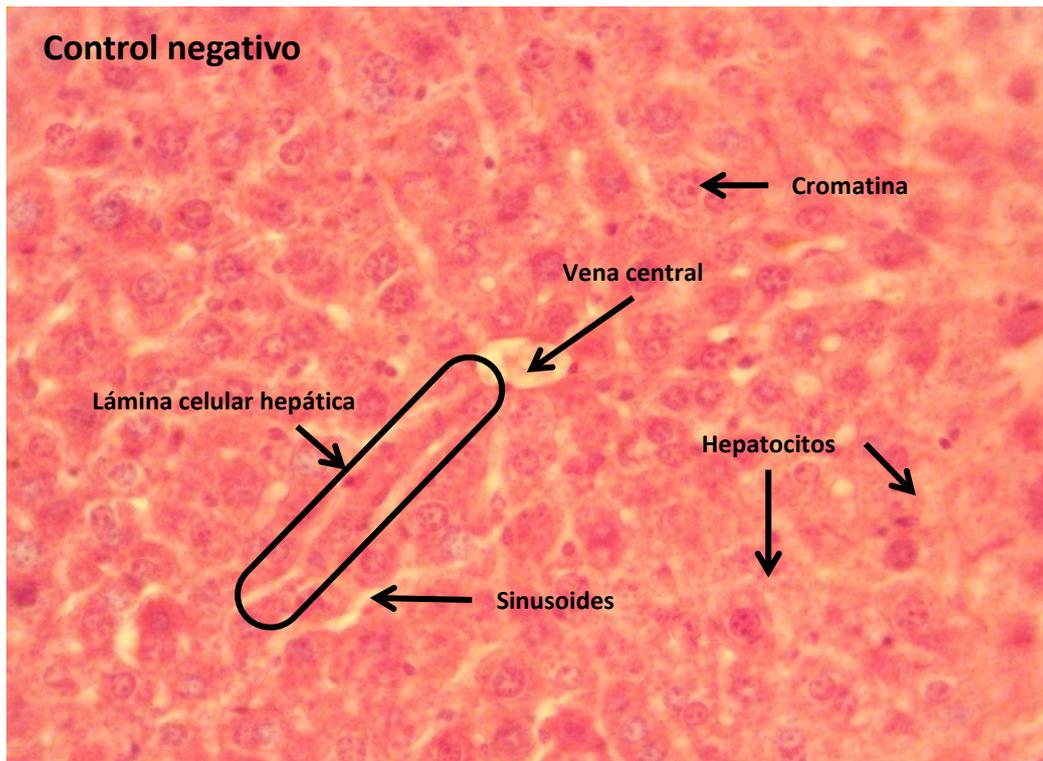


Figura 25. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado solo con solución salina 0.9%, mostrando a detalle las características del lóbulo hepático. En la imagen se muestran la vena central, lamina celular hepática, sinusoides, hepatocitos y cromatina.

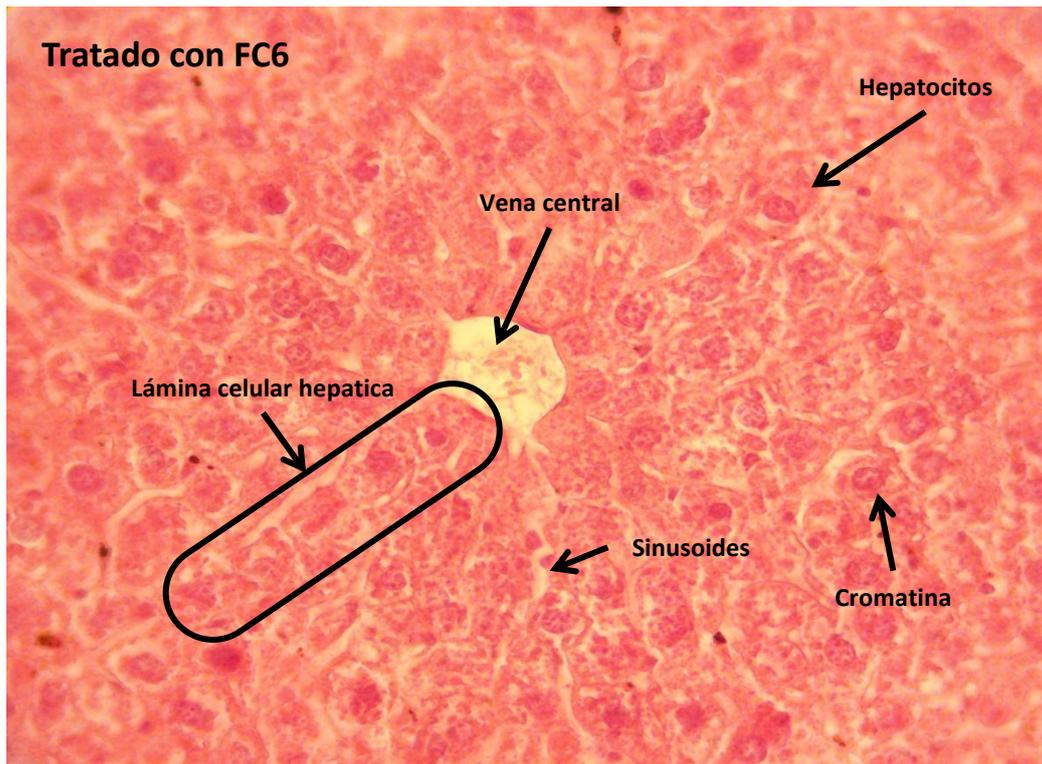


Figura 26. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado con la FC6 , mostrando a detalle las características del lóbulo hepático. En la imagen se muestran la vena central, lamina celular hepática, sinusoides, hepatocitos y cromatina.

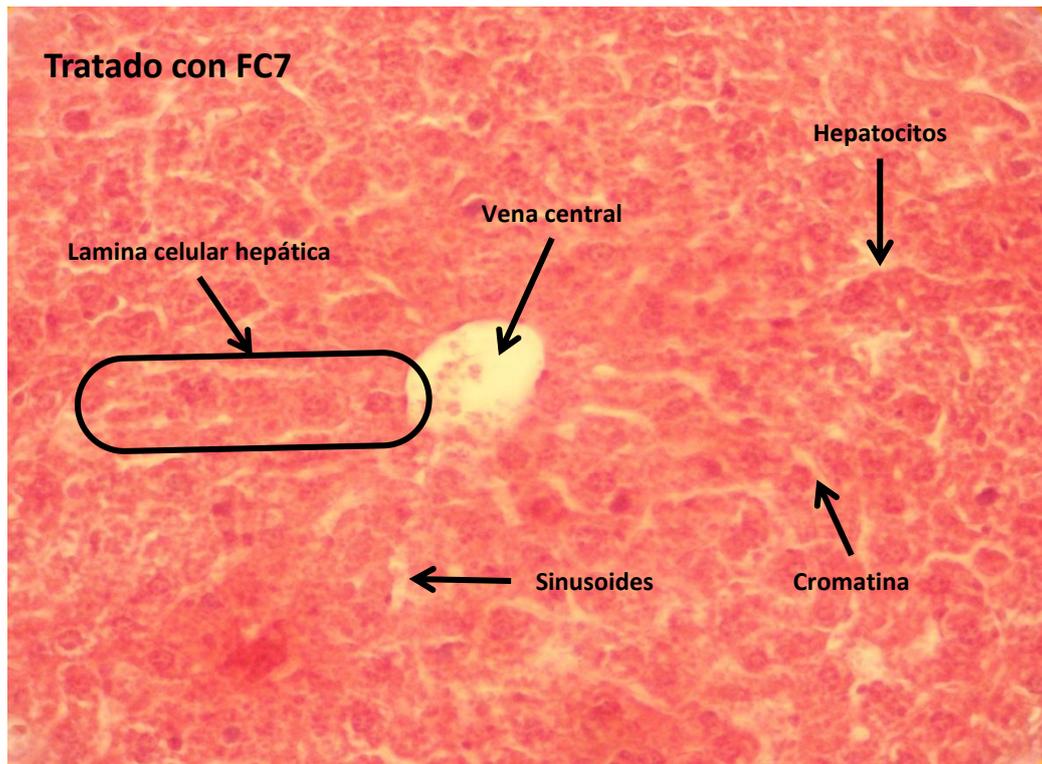


Figura 27. Corte histológico de hígado (40x) del grupo tratado con FC7, mostrando a detalle las características del lóbulo hepático. En la imagen se muestran la vena central, lamina celular hepática, sinusoides, hepatocitos y cromatina.

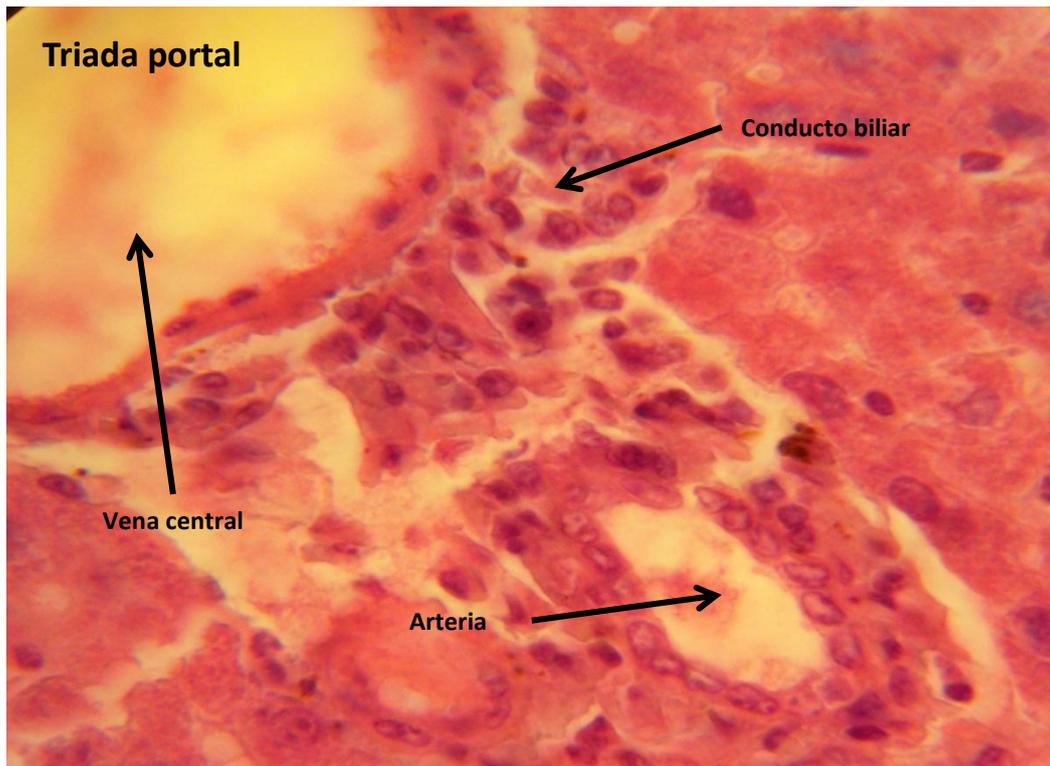


Figura 28. Triada portal hepática, corte teñido con hematoxilina y eosina (40x).

6.6. Análisis de la actividad biológica de los compuestos aislados a partir de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum*

Estos compuestos fueron aislados en el laboratorio de fitoquímica de esta facultad por el grupo de investigación del Dr. Ramiro Quintanilla Licea (Quintanilla-Licea *et al.*, 2012).

A partir de las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* se aislaron dos compuestos terpenoides (+)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-*ent*-labd-7-ene (RQ6) (Figura 29 A) y (-)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene (RQ7) (Figura 29 B). También se aisló D-glycerol-D-galacto-heptitol (Figura 29 C) y hentriacontano (Figura 29 D). Ambos compuestos terpenoides mostraron actividad citotóxica *in vitro* en contra de la línea tumoral L5178YR; el terpeno RQ6 mostró un efecto inhibidor en células de timo y bazo conforme se aumentaba la concentración (Figura 29), mientras que el heptitol y el hentriacontano, no mostraron citotoxicidad significativa en contra de la línea tumoral L5178Y-R (datos no mostrados).

El terpeno RQ6 mostró un efecto citotóxico de un 14.6% ($p < 0.05$) a la concentración de 31.35 $\mu\text{g/mL}$ y alcanzó una citotoxicidad de 77.8% ($p < 0.05$) en la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 30). Por otro lado el RQ6 no afectó de forma significativa las células de bazo pero si mostró toxicidad con células de timo, las cuales se ven afectadas desde las concentraciones de 7.8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 31).

El terpeno RQ7 mostró un efecto citotóxico de un 17% ($p < 0.05$) a la concentración de 3.9 $\mu\text{g/mL}$ y alcanzó una citotoxicidad de 35% ($p < 0.05$) en la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 32).

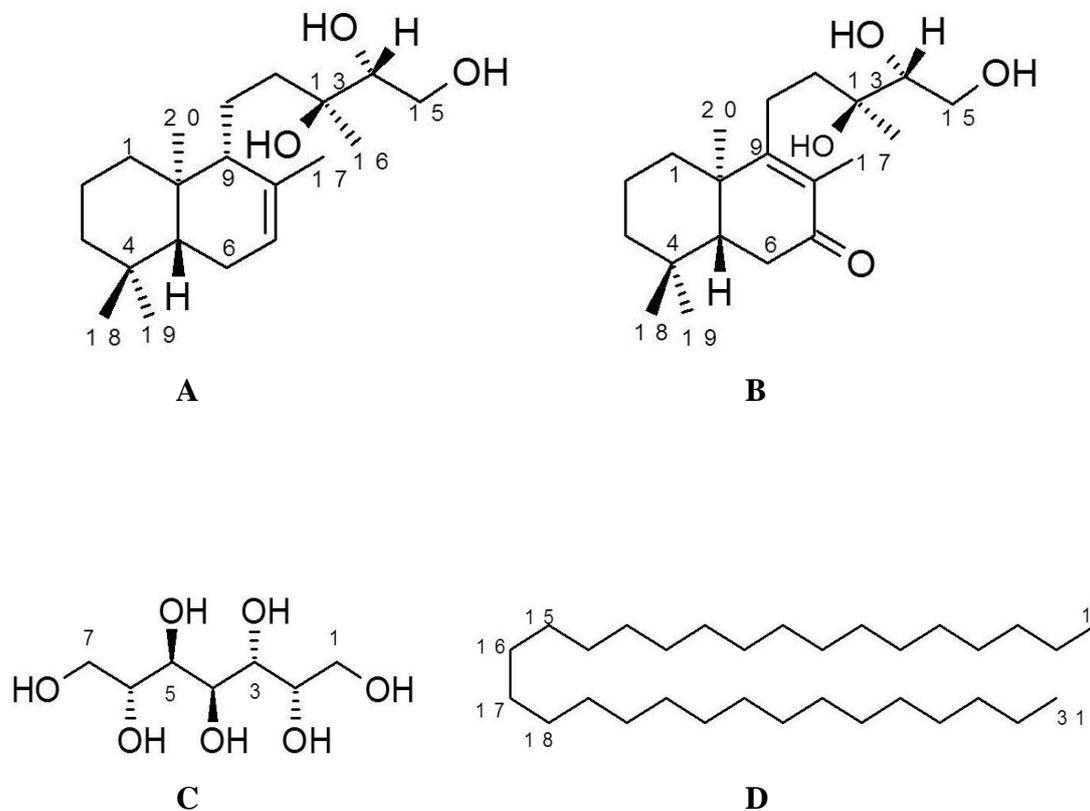


Figura 29. Moléculas aisladas a partir de extracto hexánico de *G. glutinosum*.

- A. (+)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-*ent*-labd-7-ene
- B. (-)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene
- C. D-glycero-D-galacto-heptitol
- D. Hentriacontane

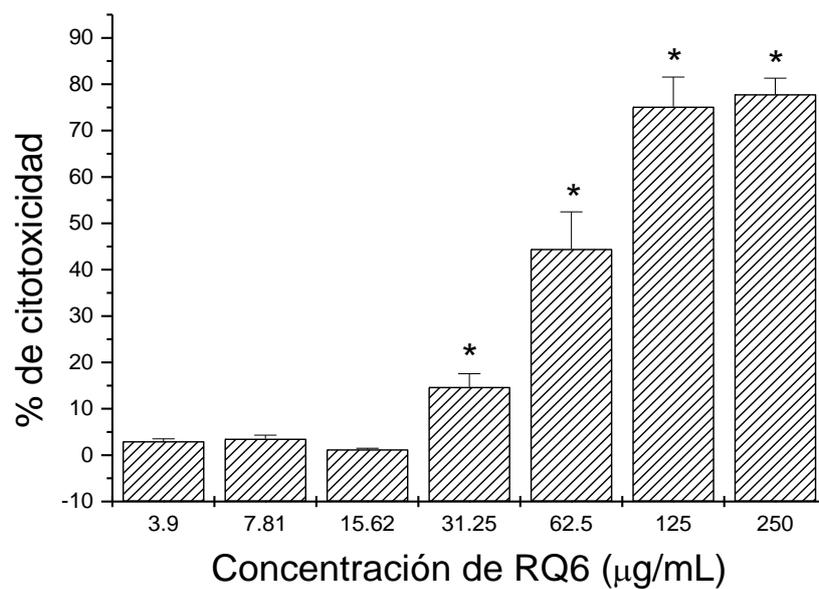


Figura 30. Efecto citotóxico del diterpeno RQ6 contra la línea linfoide L5178Y-R. Las células del linfoma se trataron con el compuesto por 48h, transcurrido ese periodo se midió su viabilidad con la técnica colorimétrica de MTT, comparando contra un control sin tratar. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$ comparado con el control sin tratar.

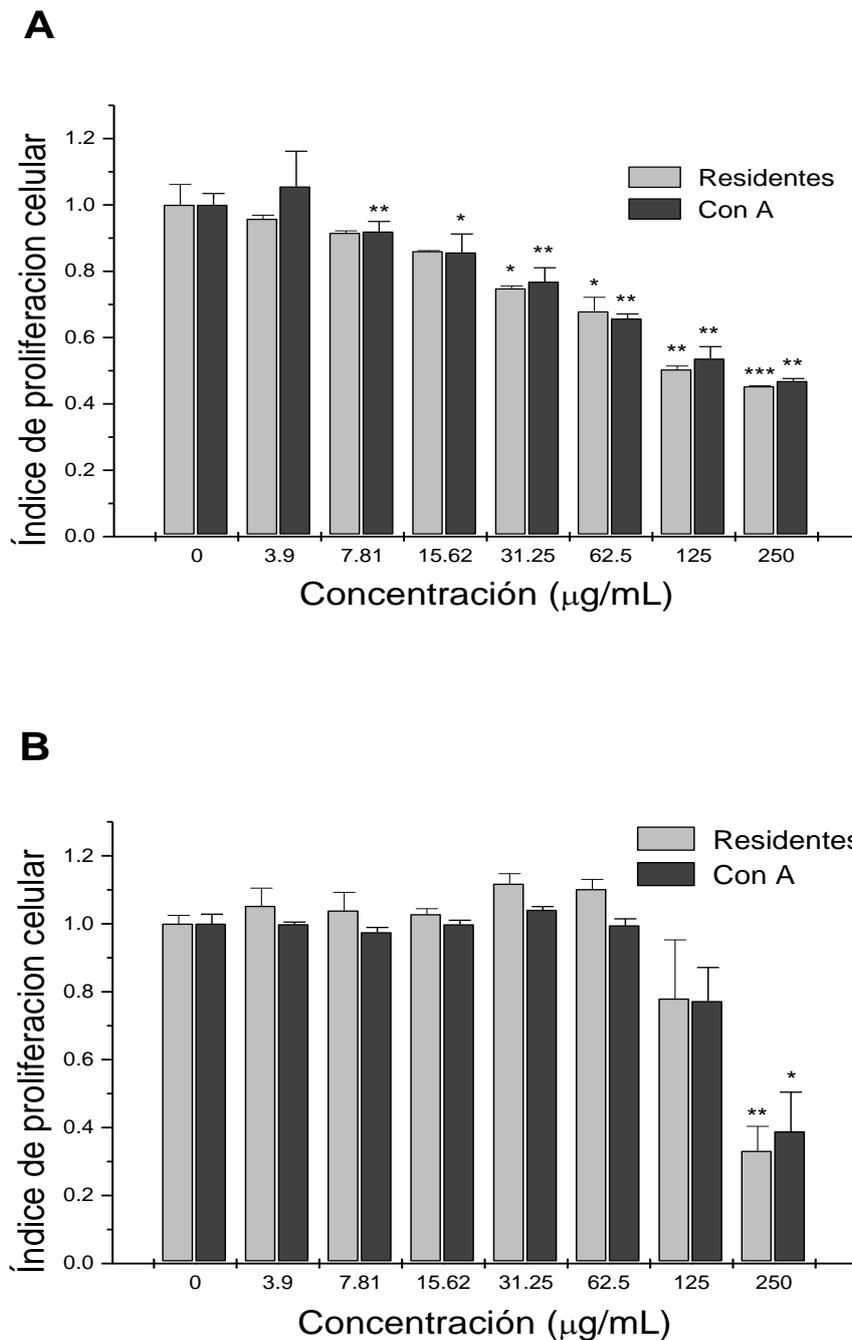


Figura 31. Efecto del RQ6 (compuesto A) sobre la linfoproliferación de células de timo (A) y bazo (B) en presencia y ausencia del mitógeno. El compuesto fue sometido a diferentes concentraciones (3.9, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 y 250µg/mL) en contra de linfocitos de timo y de bazo durante 48h, para posteriormente evaluar la proliferación celular por medio de la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

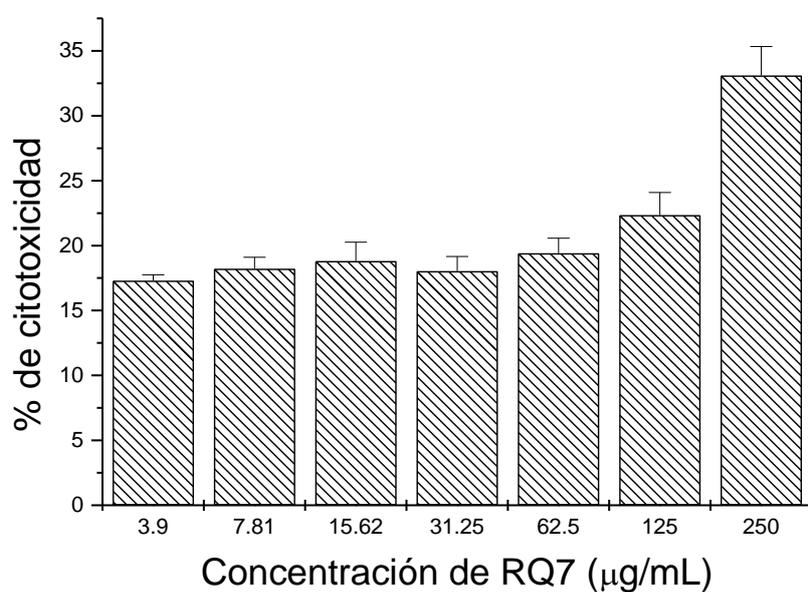


Figura 32. Efecto citotóxico del diterpeno RQ7 contra la línea linfoide L5178Y-R. Las células del linfoma se trataron con el compuesto por 48h, transcurrido ese periodo se midió su viabilidad con la técnica colorimétrica de MTT, comparando contra un control sin tratar. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

7. DISCUSIÓN

El cáncer uno de los principales problemas que aquejan a la humanidad (Boik, 1996; Rath, 2001), ha sido un problema para tratarlo ya que adquiere resistencia ante los fármacos y encontrar nuevas estrategias para controlarlo ha sido la búsqueda en plantas para encontrar compuestos anticancerígenos.

Los productos naturales representan una rica fuente de compuestos biológicamente activos y que son un ejemplo de la diversidad molecular con un alto potencial en el desarrollo de drogas (Newman *et al.*, 2000; Harvey, 2000; Grabley *et al.*, 1999). De los compuestos anticancerígenos encontrados entre 1940 y 2002, el 40% provienen de productos *per se* o son derivados de productos naturales (Newman *et al.*, 2003).

Los tratamientos que se han utilizado para combatir el cáncer (eliminación quirúrgica del tumor, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, entre otras) tienen el inconveniente de no ser selectivos entre células cancerosas y células normales, por ello la búsqueda de sustancias provenientes de fuentes naturales que tengan la capacidad estimular al sistema inmunológico, y sean capaces de inhibir, controlar o eliminar el cáncer (Gomez-Flores *et al.*, 2005); esto ha llevado a muchos investigadores a estudiar diversas plantas medicinales. Muchas plantas han mostrado tener capacidad farmacológica (Evans, 1983).

El reciente gran impacto de las drogas derivadas de las plantas es observado con gran interés en las áreas de investigación tumoral, donde compuestos como el taxol, vinblastina, vincristina y camptotecina tienen importancia por la efectiva quimioterapia en contra de cánceres (Rates, 2001).

Varias plantas han sido validadas científicamente, e incluso se han aislado sus compuestos activos, y son drogas que se utilizan para el tratamiento de cáncer en la actualidad. Extractos fenólicos de *Ichnocarpus frutescens* han mostrado actividad contra células de linfoma *in vitro* (Kumarappan y Mandral, 2007), el té verde en combinación con compuestos naturales como el resveratrol, ha mostrado actividad contra de las líneas EL-4, Jurkat, K-569 y HL-60 (Duchler y Stepnik, 2008). Existen por lo menos 120

compuestos químicos derivados de plantas que son considerados como drogas de importancia médica, que son comercializados por industrias farmacéuticas en más de un país del mundo (Taylor, 2000).

G. glutinosum usado en la medicina tradicional de México para el tratamiento de reumatismo, dolor de cabeza, fiebre, diarrea, úlceras y soldar huesos fracturados, ha tenido diversos reportes sobre su uso medicinal, donde se describen las propiedades medicinales de la planta, así como también antidiarréico, antirreumático, analgésico y regenerativo (Martínez, 1959). Reciente mente se han reportado estudios sobre su actividad antimicrobiana (Caballero-Nieto *et al.*, 2003, Gomez-Flores *et al.*, 2008).

En el presente estudio se utilizaron las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* en contra de la línea celular L5178YR, para determinar su efecto citotóxico *in vitro*, lo cual muestra inhibición de crecimiento por parte de las fracciones hacia la línea celular tal y como lo menciona Gomez-Flores *et al.*, en 2009 quienes trabajaron con extractos crudos de esta planta.

La apoptosis o muerte celular programada, es un tipo de muerte que ocurre naturalmente en las células o se puede inducir, y tal efecto apoptótico activa el sistema inmune de una forma limpia sin reacciones adversas y se puede estar incluyendo en terapias anticancerígenas, para así estimular al sistema inmune sin dañar a tejido sano.

Se observó el patrón característico de la degradación de ADN en las células tratadas *in vitro* con estas fracciones, que es parte de la segunda etapa de la apoptosis, en la cual se activan las enzimas endógenas que degradan el ADN (ADNasas) que están como cimógenos en el citoplasma celular, de manera que la enzima corta la molécula de ADN en fragmentos de longitudes equivalentes a múltiplos de 180-200 pb, formándose así el patrón escalonado que es fácilmente visible mediante electroforesis en gel de agarosa (Nagata, 2000; Nicholson *et al.*, 1997). Esto es bien reconocido como marcador bioquímico de muerte celular por apoptosis y no por necrosis (Zhou *et al.* 2003).

En el presente estudio, se encontró que las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* mostraron tener actividad citotóxica *in vitro* contra la línea tumoral L5178Y-R lo cual corroboramos la citotoxicidad de *G. glutinosum* por extractos crudos

de la planta en contra de L5178Y-R y la muerte fue inducida por apoptosis (Gómez-Flores *et al.*, 2009), lo cual nos hace suponer que la molécula o compuestos responsables de la citotoxicidad se encuentran tanto en el extracto crudo como en las fracciones.

En el presente trabajo se utilizó actinomicina D, como control positivo para apoptosis, puesto que es un inhibidor de la síntesis de ARN, lo cual incrementa la fragmentación endonucleica del ADN e induce una muerte rápida mediante apoptosis en las células L5178Y (Agarwal *et al.*, 1991).

En el estudio de inmunomodulación se utilizaron las seis fracciones que más citotoxicidad mostraron y las cuales en los ensayos de inmunomodulación no se mostró un efecto significativo en las células de timo y bazo.

En el estudio *in vivo* se utilizaron las fracciones FC6 y FC7 por presentar un mejor efecto inmunomodulador y de presentar buena actividad citotóxica. En los ratones tratados con las fracciones no se observó ningún síntoma en el sitio de la inoculación pero se observó una reducción de la masa tumoral y una sobrevida moderada.

Martínez en 1979 observó que los aceites esenciales de *G. glutinosum* en ocasiones causaban una especie de parálisis, dato que no observamos en los ratones de estudio, a pesar de la reducción tumoral. Por otro lado algunos de los ratones de estudio no mostraron una reducción tumoral aparente por lo que se sugiere el uso de más dosis del tratamiento para erradicar el tumor. A pesar de ser Balb/c una cepa sinérgica o de similitud en el complejo de histocompatibilidad, las diferencias en respuestas individuales al tratamiento es común, lo cual se observa también en humanos.

Muchos de los medicamentos que actualmente se utilizan para tratar algún malestar, traen consigo reacciones secundarias adversas para el organismo como dolores de cabeza, hipertensión, hepatotoxicidad, entre otros. Medicamentos como el paracetamol, que por medio de formación de radicales libres (Yu 1994) causa una necrosis severa en el hígado (Troncoso y Guija 2007).

A partir del extracto de *G. glutinosum* se lograron aislar 4 compuestos de los cuales los de naturaleza terpenoide (Calderon *et al.*, 2001 y Maldonado *et al.*, 1994) mostraron tener actividad citotóxica en contra del linfoma, como se han demostrado en contra de otros tumores (Betancur-Galvis *et al.*, 2002; Valente *et al.*, 2004), también se han reportado el aislamiento de flavonoides (Yu *et al.*, 1988).

Los terpenos han mostrado actividad biológica y actividad citotóxica en contra de distintos tumores, por mencionar algunos el diterpeno paclitaxel se ha observado actividad en contra de la línea de cáncer de mama MCF-7 (Nicolau *et al.*, 1995); sarcodictyins, aislado de ciertas especies de corales suaves, se ha observado que el diterpeno posee una potente actividad antitumoral (Shiff *et al.*, 1979; Ciomeli *et al.*, 1997).

Los terpenos aislados de *G. glutinosum* muestran una actividad citotóxica *in vitro* en contra de la línea L5178Y-R, mostrando su mayor efecto a las mayores concentraciones y a su vez mostrando también moderada citotoxicidad en linfocitos, esta actividad es muy probable que se deba a que en las FC hay una mezcla de compuestos y moléculas que interaccionan entre si, induciendo efectos de sinergismo o antagonismo en contra del diterpeno aislado.

Se han aislado compuestos con actividad biológica a partir de *G. glutinosum*, en los que destacan los diterpenos con actividad antifúngica (Serrano *et al.*, 2009),

La potenciación de parámetros inmunológicos inducida por los extractos de plantas, podría ser relevante en la clínica como adyuvantes en la terapia de enfermedades como infecciones virales crónicas, la tuberculosis, el SIDA y el cáncer.

Las fracciones hexánicas de *G. glutinosum* no mostraron signos de necrosis en el hígado, ni alguna alteración hepática de algún tipo, como hepatocitos binucleados (como consecuencia de la generación celular a causa de un daño), cicatrización, formación de lípidos en el interior del hepatocito. Siendo tal vez su administración segura como tratamiento ya que faltarían estudios para corroborar su eficiencia sin los efectos secundarios no deseados.

Esto indica que los compuestos presentes en las fracciones hexánicas podrían tener futuro en una terapia anti cancerígena.

8. CONCLUSIONES

El extracto hexánico de *G. glutinosum* se separó por cromatografía en columna en ocho fracciones: FC1, FC2, FC3, FC4, FC5, FC6, FC7 y FC8.

- a. Las fracciones FC1, FC3, FC4, FC5, FC6 y FC7 mostraron actividad citotóxica *in vitro* en contra de la línea L5178Y-R y la citotoxicidad fue mediada por apoptosis.
- b. Las fracciones FC1, FC3, FC4, FC5, FC6 y FC7 no afectaron la proliferación de células de timo y bazo *in vitro*.
- c. Las fracciones FC6 y FC7 presentaron efecto antitumoral *in vivo* sin presentar sintomatología de toxicidad aguda.
- d. Las fracciones FC6 y FC7 no presentaron necrosis o algún síntoma de toxicidad hepática *in vivo*.
- e. Se evaluaron dos compuestos de naturaleza terpenoide y estos mostraron actividad citotóxica *in vitro* en contra de la línea L5178Y-R.

9. APÉNDICE.

PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS

PREPARACIÓN DE MEDIOS.

Medio RPMI 1640. Se pesan 10.2 g de medio RPMI 1640 en polvo y se disuelven en 950mL de H₂O destilada; se pesan 2g de bicarbonato de sodio y se disuelven en 50mL de H₂O destilada, y a esta se le añaden 10mL de antibióticos (penicilina, estreptomina, anfotericina) y 10μL de L-glutamina, ambas soluciones se mezclan y se esteriliza por medio de filtración con vacío.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

MTT. Se disolvió 250mg de MTT en polvo en 50mL de PBS, para que se ajuste a 5mg/mL, después se esterilizó con filtro de 0.22μm, se guarda en refrigeración y se cubre de la luz.

PBS. Se disolvió 1.48g de Na₂HPO₄ en 1l de H₂O destilada, y se le agregó 0.43g de NaH₂PO₄ y 7.2g de NaCl, se esterilizó en autoclave.

Buffer de lisis de leucocitos.

SDS al 20%: 20g en 100 mL de agua destilada, se disolvió a 37°C a baño María.

DMF al 50%: Se adicionaron 100 mL de DMF en SDS al 20%. Se ajusta el pH a 4.7.

ESTANDARIZACIONES.

Curva dosis-respuesta: Proliferación *in vitro* de linfocitos de ratón activados con concavalina-A (Con A).

Para seleccionar la concentración subóptima para los ensayos de proliferación se realizó una curva de calibración del efecto del mitógeno Con A sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de timo y bazo.

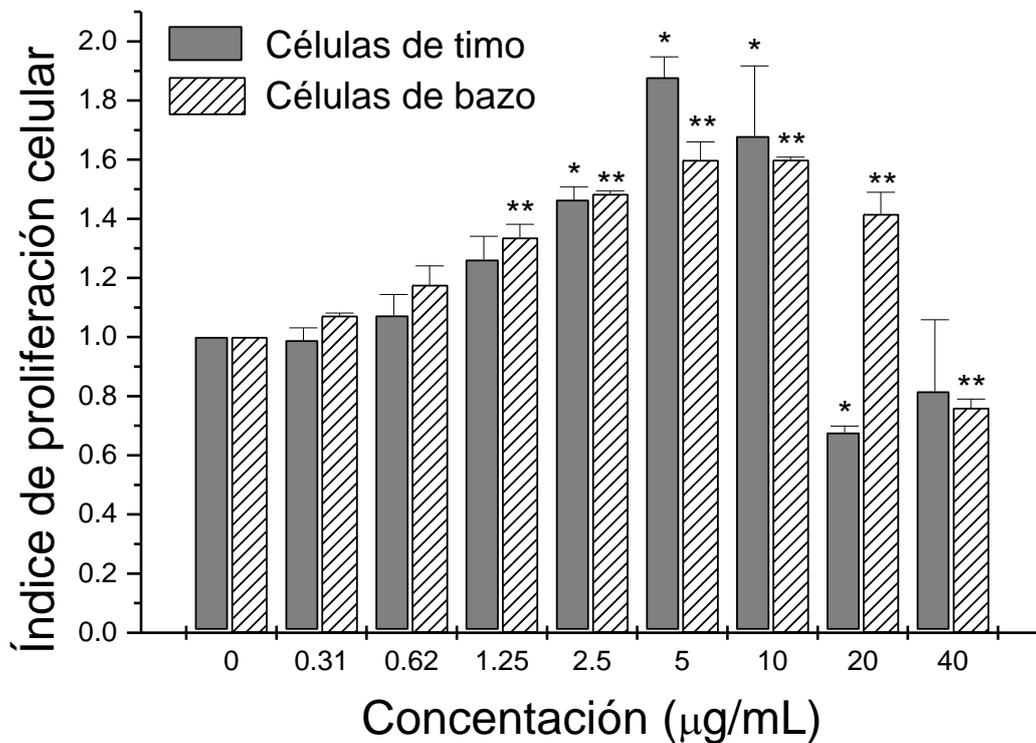


Figura 33. Efecto de la Con-A sobre la linfoproliferación de células de timo y bazo. Se evaluaron diferentes concentraciones (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 $\mu\text{g/mL}$) de Con A en la proliferación de linfocitos de timo y de bazo durante 48h, mediante la técnica de MTT. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

Efecto citotóxico de vincristina en contra de la línea tumoral L5178Y-R *in vitro*.

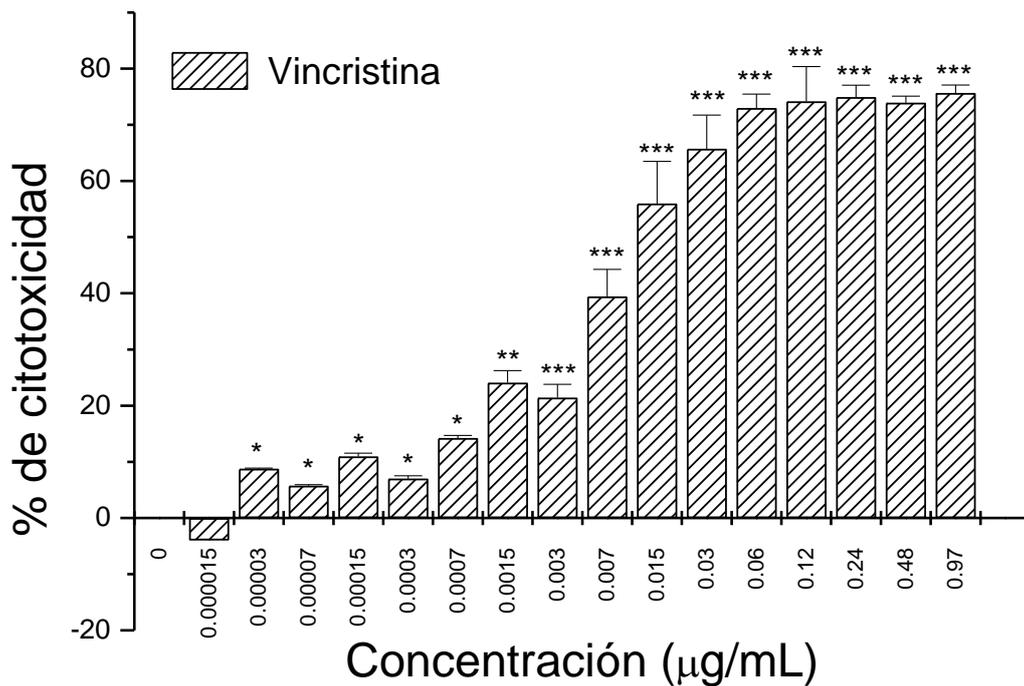


Figura 34. Efecto citotóxico de la vincristina contra la línea linfóide L5178Y-R. Las células del linfoma se trataron con el compuesto por 48h, transcurrido ese periodo se midió su viabilidad con la técnica colorimétrica de MTT, comparando contra un control sin tratar. Las densidades ópticas se leyeron a 570nm en un lector de microplacas. Los datos representan la media \pm el error estándar de tres experimentos representativos con tres repeticiones por tratamiento.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparado con el control sin tratar.

Prueba de Kaplan-Meier de probabilidad de supervivencia

Resumen del procesamiento de los casos

Tratamiento	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
Vincristina	15	9	6	40.0%
FC6	15	8	7	46.7%
FC7	15	8	7	46.7%
Vehículo	15	10	5	33.3%
Global	60	35	25	41.7%

Tabla de supervivencia

Tratamiento		Tiempo	Estado	Proporción acumulada que sobrevive hasta el momento		N° de eventos acumulados	N° de casos que permanecen
				Estimación	Error típico		
Vincristina	1	25.000	Muerto	.	.	1	14
	2	25.000	Muerto	.	.	2	13
	3	25.000	Muerto	.	.	3	12
	4	25.000	Muerto	.733	.114	4	11
	5	30.000	Muerto	.	.	5	10
	6	30.000	Muerto	.	.	6	9
	7	30.000	Muerto	.	.	7	8
	8	30.000	Muerto	.467	.129	8	7
	9	35.000	Muerto	.400	.126	9	6
	10	60.000	Vivo	.	.	9	5
	11	60.000	Vivo	.	.	9	4
	12	60.000	Vivo	.	.	9	3
	13	60.000	Vivo	.	.	9	2
	14	60.000	Vivo	.	.	9	1
	15	60.000	Vivo	.	.	9	0
FC6	1	5.000	Muerto	.933	.064	1	14
	2	25.000	Muerto	.	.	2	13

	3	25.000	Muerto	.800	.103	3	12
	4	40.000	Muerto	.733	.114	4	11
	5	45.000	Muerto	.667	.122	5	10
	6	50.000	Muerto	.600	.126	6	9
	7	55.000	Muerto	.	.	7	8
	8	55.000	Muerto	.467	.129	8	7
	9	60.000	Vivo	.	.	8	6
	10	60.000	Vivo	.	.	8	5
	11	60.000	Vivo	.	.	8	4
	12	60.000	Vivo	.	.	8	3
	13	60.000	Vivo	.	.	8	2
	14	60.000	Vivo	.	.	8	1
	15	60.000	Vivo	.	.	8	0
FC7	1	10.000	Muerto	.933	.064	1	14
	2	30.000	Muerto	.867	.088	2	13
	3	40.000	Muerto	.	.	3	12
	4	40.000	Muerto	.733	.114	4	11
	5	45.000	Muerto	.667	.122	5	10
	6	50.000	Muerto	.	.	6	9
	7	50.000	Muerto	.533	.129	7	8
	8	55.000	Muerto	.467	.129	8	7
	9	60.000	Vivo	.	.	8	6
	10	60.000	Vivo	.	.	8	5
	11	60.000	Vivo	.	.	8	4
	12	60.000	Vivo	.	.	8	3
	13	60.000	Vivo	.	.	8	2
	14	60.000	Vivo	.	.	8	1
	15	60.000	Vivo	.	.	8	0
Vehículo	1	20.000	Muerto	.933	.064	1	14
	2	25.000	Muerto	.867	.088	2	13
	3	30.000	Muerto	.	.	3	12
	4	30.000	Muerto	.	.	4	11
	5	30.000	Muerto	.667	.122	5	10
	6	35.000	Muerto	.	.	6	9
	7	35.000	Muerto	.	.	7	8
	8	35.000	Muerto	.	.	8	7
	9	35.000	Muerto	.400	.126	9	6
	10	40.000	Muerto	.333	.122	10	5
	11	60.000	Vivo	.	.	10	4
	12	60.000	Vivo	.	.	10	3

13	60.000	Vivo	.	.	10	2
14	60.000	Vivo	.	.	10	1
15	60.000	Vivo	.	.	10	0

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

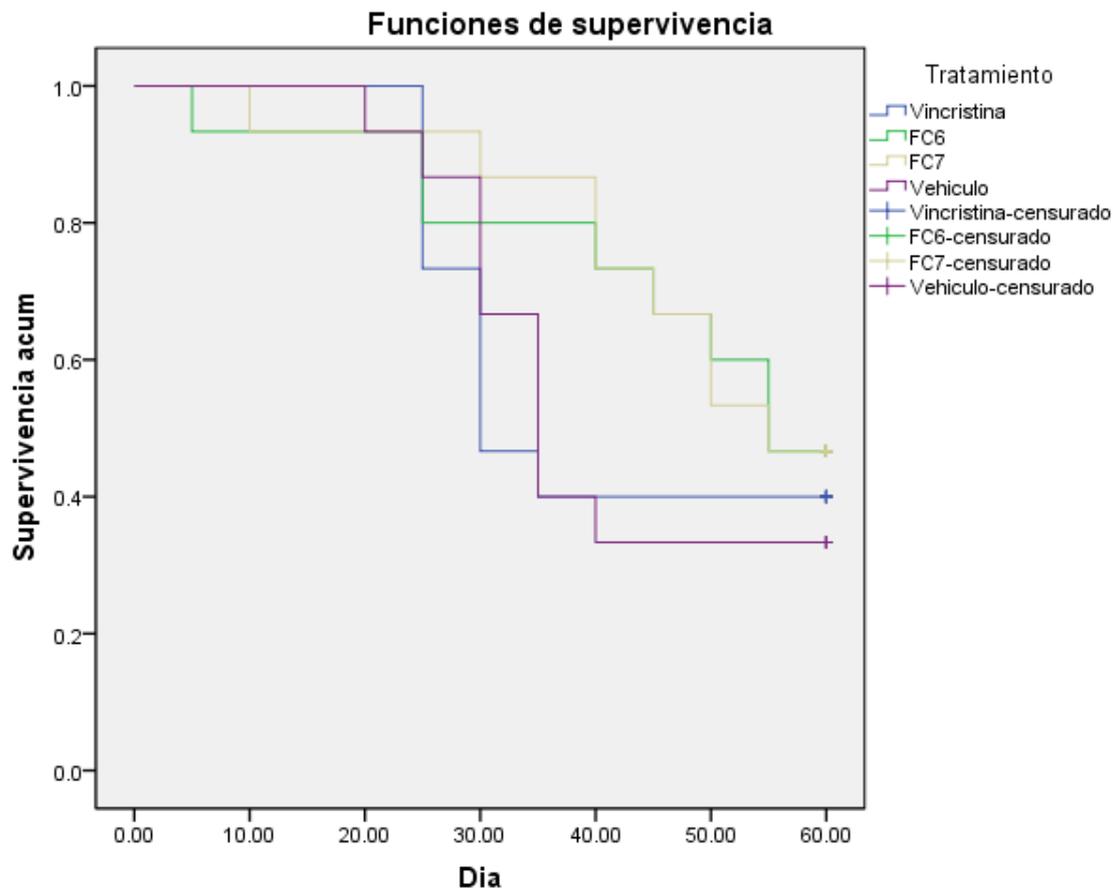
Tratamiento	Media ^a				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
Vincristina	41.000	4.061	33.041	48.959	30.000	3.864	22.426	37.574
FC6	48.000	4.264	39.643	56.357	55.000	.	.	.
FC7	49.333	3.617	42.244	56.422	55.000	.	.	.
Vehículo	41.000	3.658	33.831	48.169	35.000	2.372	30.351	39.649
Global	44.833	2.017	40.880	48.787	50.000	7.246	35.798	64.202

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1.968	3	.579
Breslow (Generalized Wilcoxon)	3.363	3	.339
Tarone-Ware	2.721	3	.437

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Tratamiento.



HISTOLOGÍA

Agua Ácida.- Se prepara adicionando 20 gotas de HCl concentrado en 250mL de H₂O destilada

Agua Amoniacal.- Se prepara adicionando 20 gotas de hidróxido amonio en 250mL de H₂O destilada

Albúmina de Mayer Modificada. Se bate la albúmina de huevo fresco (claras) hasta punto de nieve y se incorpora poco a poco la glicerina pura, la relación entre la albúmina y la glicerina es 1:1, se filtra con fibra de vidrio (pelo de ángel) agregando un cristal de timol, para que no se descomponga, tarda varios días en filtrarse. Después del filtrado se le agrega más timol y se guarda en un frasco claro bien tapado

10. LITERATURA CITADA

ACS. American Cancer Society 2010. Cancer Facts and Figures 2010. Atlanta Georgia. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol>

Abreu PM, Branco PS. 2003. Natural product-like combinatorial libraries J. Braz. Chem. Soc., 14(5): 675-712.

Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. 1991. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. Cancer Res. Nov 1;51(21): 5993-6.

Arbuck, S. G. y Blaylock, B. A. 1995. "Taxol: clinical results and current issues in development", en Suffness, M. (Editor). Taxol: science and applications. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 379-415.

Auyang S. 2006. Cancer causes and cancer research on many levels of complexity. Revisado agosto del 2010. Disponible en: <http://www.creatingtechnology.org/biomed/cancer.pdf>

Beer JZ, Budzicka E, Niepokojczycka E, Rosiek O, Szumiel I, Walicka M. 1983. Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during *in vitro* growth of L5178Y murine lymphoma cells. Cancer Research, 43 (10): 4736-4742

Beerhues L. 2006. Hyperforin. Phytochemistry 67 (20): 2201-2207.

Benichou C. 1990. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. J Hepatol. 11:272-276.

Betancur-Galvis L, Zuluaga C, Arno M, Gonzalez MA, and Zaragoza R. 2002. Cytotoxic effect (on tumor cells) and *in vitro* antiviral activity against herpes simplex virus of synthetic spongiane diterpenes. J. Nat. Prod. 65, 189-192

Boik J. 1996. Cancer and natural medicine. Oregon Medical Press: Minnesota, pp. 5-14.

Boik J. 2001. Natural compounds in cancer therapy. Oregon Medical Press: Minnesota, USA

Boise LH, González-García M, Postema CE. 1993. Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*;74:597-08.

Caballero-Nieto J, Lira-Saade R, Parrales-Serrano R, Hernández-Delgado T. 2003. Actividad antibacteriana de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. de dos localidades en: XXII Coloquio de investigación Iztacala, México.

Canales M, Hernández T, Serrano R, Hernández LB, Duran A, Ríos V, Sigríst S, Hernández HL, García AM, Angeles-López O, Fernández-Araiza MA, Avila G. 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *J Ethnopharmacol*, 110(2):343-7

Calderon JS, Segura-Correa R, Cespedes CL, Toscano RA. 2001. Crystal and molecular structure of (-)-17-hydroxy-neo-clerod-3-en-15-oic acid from *Gymnosperma glutinosum*. *Analytical Sciences*. 17(12):1467-8.

Castro-Martínez MG, Molina-Corona A, Martínez-Martínez JM, Gallardo-Cabrera VE, Liceaga-Craviotto MG. 2011. Hepatotoxicidad por amoxicilina-clavulanato y revision de bibliografía. *Med Int Mex*. 27(4): 406-410.

Chen X, Yano Y, Hasuma T, Yoshimata T, Yinna W, Otani S. 1999. Inhibition of farnesyl protein transferase and P21ras membrane association by d-limonene in human pancreas tumor cells *in vitro*. *Chin Med Sci J* 14:138-144.

Crowell PL, Chang RR, Ren Z, Elson CE, Gould MN. 1991. Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-Limonene and its metabolites. *J Biol Chem*. 266:17679-17685.

Cuendert M, Pezzuto JM. 2004. Antitumor activity of bruceantin: an old drug with new promise. *Journal of Natural Products* 67(2):269-72.

Cuendert M, Christov K, Lantvit DD, Deng Y, Hedayat S, Helson L, McChesney JD, Pezzuto JM. 2004. Multiple myeloma regression mediated by bruceantin. *Clinical Cancer Research* 10(3):1170-9.

- Duke, J.A. 1973. Utilization of *Papaver* Econ. Bot. 27:390-400.
- Duchler M y Stepnik M. 2008. Cytotoxic effects of a combination of three natural compounds to leukemia cells *in vitro*. Cancer therapy. 6,733-740.
- Evans F, Taylor S. 1983. Pro-inflammatory, tumor-promoting and anti-tumor diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 44: 1-99
- Fabricant DS, Farnsworth NR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery environmental health perspectives 109(1):69-75.
- Fischer GA. 1959. Nutritional and amethopterin-resistant characteristics of leukemic clones. Cancer Res., 79: 372-376.
- García-Alvarado JS, Verde-Star MJ, Heredia NL. 2001. Traditional uses and scientific knowledge of medicinal plants from Mexico and Central America. A review. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 8:37-89.
- Gartner M, Muller T, Simon JC, Giannis A, Sleeman JP. 2005. Aristoforin, a novel stable derivative of hyperforin, is a potent anticancer agent. Chembiochem : a European journal of chemical biology. 6(1):171-7.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. The Journal of Cell Biology 119(3):493-501.
- Grabley IS, Thiericke R & Zeeck A. 1999. The Chemical screening approach. Drug Discovery from Nature (Grabley S & Thiericke R, eds), pp. 124-148. Springer Verlag, Berlin.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2002. Cancer and the Immune System En : Immunology. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. (eds) W. H. Freeman and company: New York. pp 499-522.
- Gomez-Flores R., Caballero-Hernández D, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C, Tamez-Guerra P., Rice CK, Hicks ME, Weber RJ. 2005 Increased Survival of

Tumor-bearing Mice by the Delta Opioid SNC 80. *Anticancer Research* 25:4563-4568.

Gomez-Flores R, Arzate – Quintana C., Quintanilla – Licea R., Tamez – Guerra P., Monreal – Cuevas E., Rodríguez – Padilla C. 2008. Antimicrobial Activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae)(Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less (Asteraceae) Leaf Extracts and Active Fractions Against *Mycobacterium tuberculosis*. *American Eurasian Journal of Scientific Research*.3(2):188-194.

Gomez-Flores R., Verastegui-Rodriguez L., Quintanilla-Licea R., Tamez-Guerra P., Monreal-Cuevas E., Tamez-Guerra R. y Rodriguez-Padilla C. 2009. Antitumor properties of *Gymnosperma glutinosum* leaf extracts. *Cancer Investigation*, 1532-4192, 27 (2): 149 – 155.

Gomez-Flores R., Hernández-Martínez H., Tamez-Guerra P., Quintanilla-Licea R., Monreal-Cuevas E., Rodríguez-Padilla C., 2010, Antitumor and Immunomodulating potential of *Coriandrum sativum*, *Piper nigrum* and *Cinnamomum zeylanicum*, *Journal of Natural Products*, 3, 54-63.

Gomez-Flores R., Quintanilla-Licea R., Verde-Star MJ, Morado-Castillo R., Vazquez-Diaz D., Tamez-Guerra R., Rodríguez-Padilla C. 2012. Long chain alkanes and *ent-labdane* type diterpenes from *Gymnosperma glutinosum* with cytotoxic activity against the murine lymphoma L5178Y-R. *Phytotherapy Research*. 4-63.

Harvey A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today*. 5(7):294– 300

INI Instituto Nacional Indigenista. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional mexicana, Tomo II, 1a. Ed., México. pp. 584-1193.

Kaufman PB, Cseke LJ, Waber S, Duke JA, Briemann HL. 1999. *Natural Products From Plants*. CRC Press: USA. pp 88, 125-165.

Kumarappan CT y Mandal SC. 2007. Antitumor activity of polyphenolic extract of *Ichnocarpus frutescens*. *Experimental Oncology*. 94-101.

Larrey D. 2002. Epidemiology and individual susceptibility to adverse drug reactions affecting the liver. *Semin Liver Dis.* 22: 145–55.

Lee WM. 2003. Review article: Drug-Related Hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine.* 349:474-485.

Maldonado M, Segura-Carrera R, Ortega A, Calderón JS, Fronczek FR, 1994. Ent-Labdane y Neo-Clerodore diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 35:721-724.

Maltzman TH, Hurt LM, Elson CE, Tanner MA, Gould MN.1989. The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. *Carcinogenesis.* 10:781-783.

Martin SJ, Green DR, Cotter TG. 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 26-30.

Martínez, 1979. *Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas.* Fondo de Cultura Económica, México. p. 1220.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* 65:55–63

Murphy MC. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology,* 12(4):564-582.

Nagata S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research;* 256: 12-8.

Navarro VJ, Senior JR. 2006. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 354:731-739

Newman DJ, Cragg GM, Snader K. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep,* 17: 215-234.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod,* 66:1022-1037.

- Nicolau, K. C.; Xiao, X.; Parandoosh, Z.; Senyei, A.; Nova, M. P. 1995. Radiofrequency encoded combinatorial chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 34, 2289..
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochemical Science*; 22: 299-306.
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- Pinn G. 2001. Herbal medicine in oncology. *Aust Fam Physician* 30(6):575-80.
- Qian F, Hanahan DI, Weissman L. 2001. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 27;98(7):3976-81.
- Quintanilla-Licea R., Morado-Castillo R., Gomes-Flores R. Laatsch H., Verde-Star MJ., Hernández-Martínez H., Tamez-Guerra P., Tamez-Guerra R. Rodríguez-Padilla C. 2012. Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds From *Gymnosperma glutinosum* leaves. *Molecules*. Pp 11229-11241.
- Rates SM. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 39:603-613.
- Rath M., 2001. *Cancer. Cellular Health Series* M.D. MR Publishing, Inc., Santa Clara, CA 95054.
- Romo de Vivar A. 1985 *Productos Naturales de la flora mexicana*. 1ª edición LIMUSA. México. Pp. 7-209.
- Sanchez-Torres L. E. y Diosdado-Vargas F. 2003 Apoptosis: el fenómeno y su determinación, *Tec Pecu Mex* 41(1):49-62.
- Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC. 2002. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 21(8):1242-50.

Serna-Saldivar SO. 2006. El descubrimiento de fármacos naturales anticancerígenos Rev Conocimiento. 40, 7-10.

Sgro C., Clinard F., Ouazir K. 2002. Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population based stud. Hepatology 36:451-455.

Sierra F., Torres P. 2004. Enfermedad hepática tóxica inducida por drogas: Revisión sistemática estructurada. Annals of Hepatology 3(1):10-25.

Taylor L. 2000. Capitulo 2 *Plant Based Drugs and Medicines* del libro *The Healing Power of Rainforest Herbs*, Raintree Nutrition, Inc., Carson City.

Tejada-Cifuentes F. 2010. Hepatotoxicidad por fármacos. Rev Clin Med Fam. Pp: 177-191.

Troncoso L y Guija E. 2007. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. An Fac Med Lima. 68 (4) 333-343.

Underhill W. 2005. Nature's Drugs: Scientists tend to prefer the lab to the mess and complication of living beings. Now they realize that forests and oceans hold a bounty of useful chemicals. Newsweek International Nov pp 44-45.

Valente, C.; Ferreira, M.J.; Abreu, P.; Gyémánt, N.; Ugocsai, K.; Hohmann, J.; Molnár, J. 2004. Pubescenes, jatrophane diterpenes, from *Euphorbia pubescens*, with multidrug resistance reversing activity on mouse lymphoma cells, *Planta Medica*, 70: 81-84.

Villalva J. Monografías.com: Cáncer. Disponible en el sitio: <http://www.monografias.com/trabajos12/cance/cance.shtml>.

Wani M. C., H. L. Taylor , M. E. Wall , P. Coggan , A. T. McPhail. 1971. Plant antitumor agents. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J. Am Chem Soc. 93(9)2325-7.

Wink M. 1999. Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology. CRC.

Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*.74(1):139-62.

Yu, S., Fang, N., Mabry, T. J. 1988. Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 27 (1), 171-177

Zamora M. 2001. Información y análisis para el manejo forestal sostenible:integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13países tropicales en América latina (gcp/rla/133/ec) Análisis de la información sobre productos forestales no madereros en América Latina. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales Gobierno de México <http://www.semarnat.gob.mx>.

Zandman-Goddard G. y Blank M. 2002. Apoptosis and autoimmunity, *IMAJ* 4:722-724

Zhou BR, Gumenscheimer M, Freudenberg M., Galanos3 C. 2003. A striking correlation between lethal activity and apoptotic DNA fragmentation of liver in response of *D*-galactosaminesensitized mice to a non-lethal amount of lipopolysaccharide1 *Acta Pharmacol Sin Mar*; 24 (3): 193-198.

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Humberto Carlos Hernández Martínez

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Inmunobiología

TESIS: Evaluación preclínica de las fracciones hexánicas de *Gymnosperma glutinosum* en modelo de linfoma L5178Y-R.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacido en la ciudad de Monterrey del estado de Nuevo León, el 17 de abril de 1985, hijo de Humberto N. Hernández Martínez y de Norma C. Martínez Chávez.

Educación: Engresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2009.

Experiencia Profesional: Ayudante de laboratorio en Laboratorio de Análisis Clínicos Moreno –Arzaga (2006-2008), Químico analista en laboratorio de Análisis Clínicos en Santos Hospital (2008-2010).

Experiencia en Docencia: Profesor de Ciencias en el Instituto San Roberto (Febrero 2012- a la fecha).

PRODUCTOS ENTREGABLES

Participación en: **6to SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INMUNOTERAPIA EN CANCER Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS, 16 AL 18 DE NOVIEMBRE DEL 2011, FCB-UANL.**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La Universidad Autónoma de Nuevo León y el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas otorgan a:

Humberto Carlos Hernández-Martínez, Ricardo Alberto Gómez-Flores, Patricia Tamez-Guerra, Ramiro Quintanilla-Licea

la presente

Constancia

Por su trabajo "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS FRACCIONES HEXÁNICAS DE *Gymnosperma glutinosum* EN CONTRA DEL LINFOMA MURINO L5178Y-R" presentado en CARTEL durante el 6º Simposio Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas realizado por el Cuerpo Académico Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas los días 16, 17 y 18 de Noviembre.

"*Alere Flammam Veritatis*"

Ciudad Universitaria, Noviembre de 2011

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas



6º Simposio Internacional de Inmunoterapia en Cáncer y Enfermedades Infecciosas

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas



Article

Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from *Gymnosperma glutinosum* leaves

Ramiro Quintanilla-Licea^{1,*}, Rolando Morado-Castillo¹, Ricardo Gomez-Flores², Hartmut Laatsch³, María Julia Verde-Star¹, Humberto Hernández-Martínez², Patricia Tamez-Guerra², Reyes Tamez-Guerra² and Cristina Rodríguez-Padilla²

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Pedro de Alba S/N, Cd. Universitaria, 66450 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

² Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Pedro de Alba S/N, Cd. Universitaria, 66450 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

³ Georg-August-University of Göttingen, Institute for Organic and Biomolecular Chemistry, Tammannstrasse 2, D-37077 Göttingen, Germany

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:

Ramiro.quintanillalc@uanl.edu.mx;

Tel.: +52-81-83763668.

Received: 16 July 2012; in revised form: 7 September 2012 / Accepted: 10 September 2012 / Published: September 2012

Abstract: Bioassay-guided fractionation of hexane extracts from *Gymnosperma glutinosum* (Asteraceae) leaves, collected in North Mexico, rendered the known compounds hentriacontane (**1**) and (+)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-*ent*-labd-7-ene (**2**) as well as the new *ent*-labdane diterpene (-)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene (**3**). In addition, D-glycero-D-galacto-heptitol (**4**) was isolated from the methanolic extract of this plant.

Their structures were established on the basis of high-field 1D- and 2D NMR methods supported by HR-MS data. The cytotoxic activity was determined by using the *in vitro* L5178Y-R lymphoma murine model. Hentriacontane (**1**) and the new *ent*-labdane **3** showed weak cytotoxicity, whereas the *ent*-labdane **2** showed significant ($p < 0.05$) and concentration dependent cytotoxicity (up to 78 %) against L5178Y-R cells at concentrations ranging from 7.8 to 250 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Gymnosperma glutinosum*, Asteraceae, Mexican medicinal plant, Lymphoma cells, Cancer, *ent*-Labdane diterpenes

1. Introduction

Cancer still belongs to the second leading cause of death in industrialized countries [1]. The fate of many cancer patients, for whom cure of their disease is not a reality, is becoming ever more an issue. As repeatedly shown by the National Cancer Institute (USA), more than two thirds of the anticancer drugs approved between the 1940s and 2006 are either natural products or were developed based on the knowledge gained from natural products [2-5].

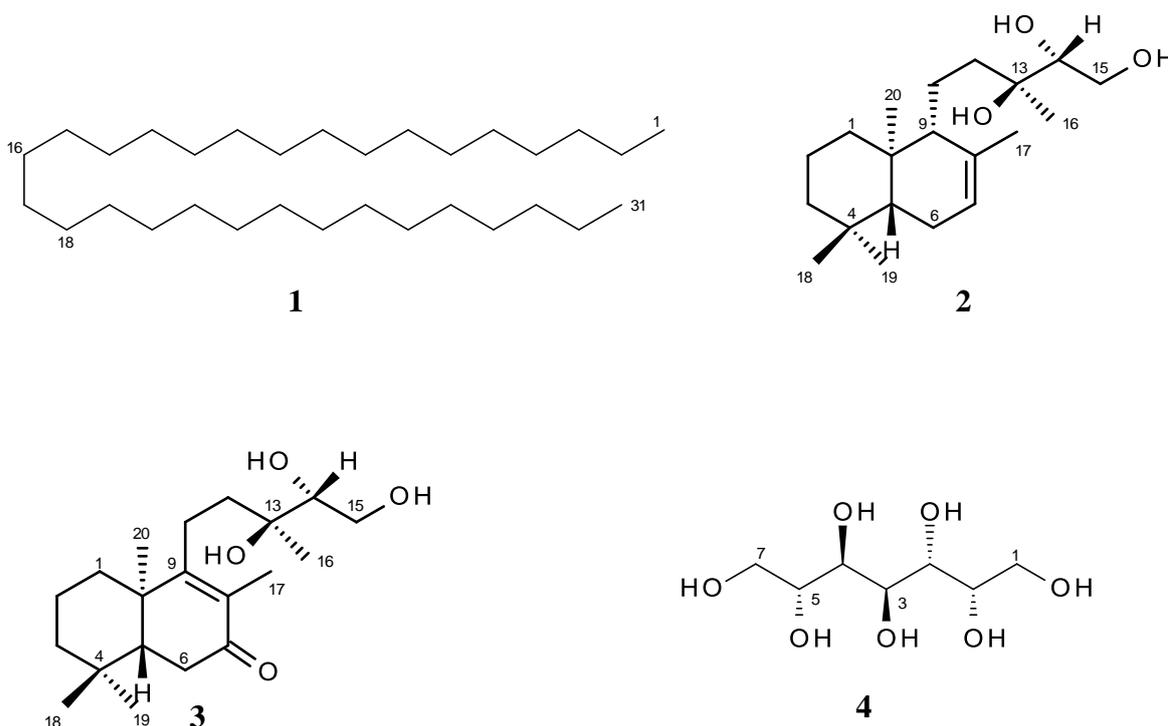
On the other side, phytotherapy represents the oldest form of therapy worldwide; more than 21,000 plant species are used in herbal medicines, according to the World Health Organization [1].

Particularly, phytotherapy is practiced by a large part of the Mexican population for the treatment of many diseases. To promote the proper use of herbal medicines and to determine their potential use as source for new drugs, it is essential to study medicinal plants and scientifically validate their use [6-9]. This is the case for *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less, (Asteraceae) known in Mexico as *Tatalencho*, *Jarilla*, *Mota*, *Hierba Pegajosa*, *Escobilla*, *Pegajosa* [10], which is traditionally used to treat diarrhea, ulcers and rheumatism [11]. This shrubby, monotypic plant is distributed from Guatemala throughout Mexico to the southwestern region of the United States [12, 13]. It is closely related to the *Gutierrezia* genus, small shrubby plants with slender stems that are herbaceous above and woody near the base, covered from summer through fall with masses of tiny yellow flowers borne in terminal clusters. The stems, leaves and flowering heads are covered with a glutinous or sticky substance.

It has been reported that *Gymnosperma glutinosum* contains essential oils [14], flavonoids [15-19] and diterpenes [20-24], and recent studies have validated the ethnobotanical use of this plant in Mexico [24-26]. Gomez-Flores *et al.* showed anti-tumor activity of the hexane extract of *G. glutinosum* leaves against L5178Y-R lymphoma cells [27]; we have expanded our investigation on this plant by elucidating

the chemical structure of the putative bioactive compounds present in *G. glutinosum*. We are describing now the bioassay-guided isolation of hentriacontane (**1**), (+)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-*ent*-labd-7-ene (**2**) and (-)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene (**3**), a new *ent*-labdane diterpene, as well as D-glycero-D-galacto-heptitol (**4**). The structure of these compounds (Fig. 1) was elucidated by analysis of the spectroscopic data and their cytotoxic activity was determined by using the *in vitro* L5178Y-R lymphoma murine model [27].

Figure 1. Structures of compounds **1-4**.



2. Results and Discussion

2.1. Structure elucidation

The structures of the known compounds **1**, **2** and **4** were established by comparison of their spectroscopic data with literature values. Hentriacontane (**1**), a solid long-chain alkane ($C_{31}H_{64}$), is found in a variety of plants [28, 29], but it has not yet been isolated from *G. glutinosum*. The occurrence of the *ent*-labdane diterpene **2** ($C_{20}H_{36}O_3$) in *G. glutinosum* has been reported in the literature [22], but no biological activity was described so far.

Compound **3** was isolated as a colorless oil with $[\alpha]_D^{20} = -16.5$ (c 2.0, $CHCl_3$). (+)-ESI MS exhibited an ion peak $[M + Na]^+$ at $m/z = 361$ ($C_{20}H_{34}O_4Na$) and HR-ESI-MS showed an $[M + H]^+$ ion at $m/z = 339.25300$, confirming a molecular formula of $C_{20}H_{34}O_4$.

The ^1H NMR spectrum (Table 1) showed five methyl singlets at $\delta_{\text{H}} = 0.85, 0.87, 1.05, 1.22$ and 1.72 , characteristic signals of a labdane diterpene skeleton [30-32]. The ^{13}C NMR spectrum of **3** (Table 1), in agreement with the molecular formula, revealed signals corresponding to 20 carbon atoms in the molecule. Analysis of the ^{13}C NMR and DEPT 135 spectral data with the aid of the HSQC spectra, led to the deduction of the multiplicities of the carbon atoms and established the presence of five methyl signals (11.3, 18.1, 21.3, 22.7, 32.5), two tetrasubstituted olefinic carbons (130.1, 168.6), seven aliphatic methylenes (18.6, 23.1, 35.1, 35.9, 36.4, 41.2, 63.2), two methines (50.2, 70.2), one oxygenated quaternary carbon (74.4), one carbonyl group (200.5), and two quaternary carbons (33.1, 41.1). The above signals and an ABX system in the ^1H NMR spectrum of **3** for protons geminal to hydroxyl functions (one methylene ($\delta_{\text{H}} = 3.69$, m, 2H; $\delta_{\text{C}} = 63.2$) and one methine ($\delta_{\text{H}} = 3.49$, m, 1H; $\delta_{\text{C}} = 77.2$) corresponding to a primary and secondary alcohol) indicated a diterpene with *ent*-labdane skeleton whose structure is similar to the (+)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-*ent*-labd-7-ene (**2**) previously isolated by Maldonado from *Gymnosperma glutinosum* [22].

Furthermore, comparison of the ^1H - and ^{13}C NMR spectral data of **3** with **2** allowed the assignment of **3** as (-)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene, as compound **3** did not show any olefinic proton signal in the ^1H NMR spectrum ($\delta_{\text{H}} = 5.37$ in **2**), and in the ^{13}C NMR spectrum only two signals for methine carbons (three methine signals in **2**) were present, but additionally a ketocarbonyl signal ($\delta_{\text{C}} = 200.5$) was found. An ABX signal at $\delta_{\text{H}} 2.31/2.41$, not present in the spectrum of **2**, showed an HMBC coupling with the carbonyl group ($\delta_{\text{C}} = 200.5$) and a COSY correlation with H-5 ($\delta_{\text{H}} = 1.67$). It corresponds therefore to CH_2 -6, indicating a change of the double bond in **2** from position Δ^7 to position Δ^8 in **3** as well as the presence of a carbonyl function at carbon 7 in **3**. This was confirmed by the HMBC correlation of Me-17 with CO-7 (and C-8, 9) and by the coupling of Me-20 with the β -olefinic carbon C-9. Further HMBC couplings are summarized in Fig. 2. The IR spectrum of **3** displayed accordingly absorption bands at $1640, 1690$ and 3370 cm^{-1} , corresponding to a double bond, an α,β -unsaturated keto group and hydroxyl functions.

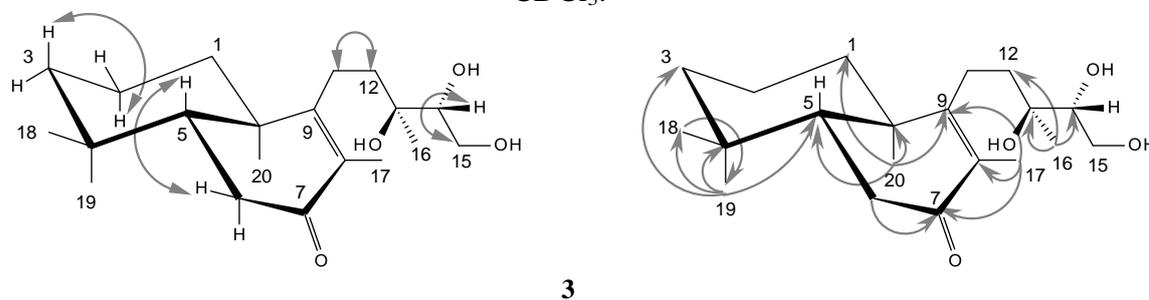
We assume in **3** the same configuration as in **2** for the respective chiral carbons (5, 10, 13 and 14), as **3** is probably formed by oxidation of **2** in the plant cells.

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) data of compound **3** (CDCl_3)

Position	^{13}C		^1H
	δ	(DEPT)	δ , mult, (<i>J</i> in Hz)
1	35.9	CH_2	1.27 m, 1.85 m
2	18.6	CH_2	1.45 m, 1.54 m
3	41.2	CH_2	1.16 m, 1.40 m

4	33.1	C _q	-
5	50.2	CH	1.67 m
6	35.1	CH ₂	2.31 m, 2.41 m
7	200.5	C=O	-
8	130.1	C _q	-
9	168.6	C _q	-
10	41.1	C _q	-
11	23.1	CH ₂	2.22 m, 2.36 m
12	36.4	CH ₂	1.43 m, 1.64 m
13	74.4	C _q	-
14	77.2	CH	3.49 m
15	63.2	CH ₂	3.69 m
16	22.7	CH ₃	1.22 s
17	11.3	CH ₃	1.72 s
18	32.5	CH ₃	0.85 s
19	21.3	CH ₃	0.87 s
20	18.1	CH ₃	1.05 s
OH			3.60 br s

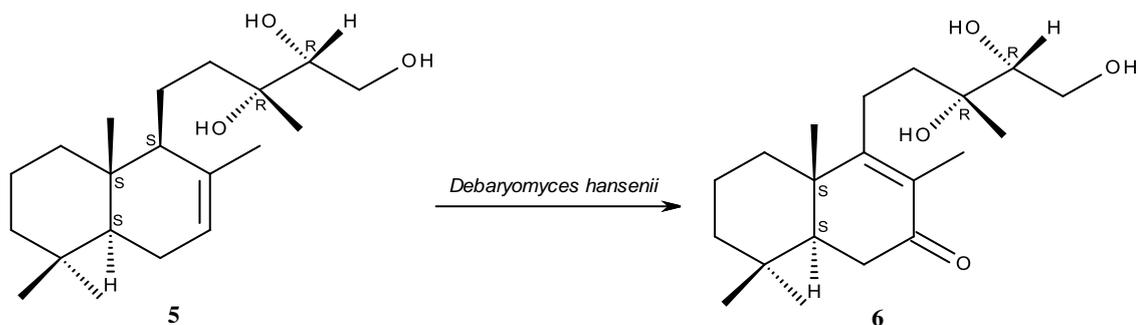
Figure 2. Selected H,H COSY (\leftrightarrow) and HMBC (\rightarrow) correlations of diterpene **3** in CDCl₃.



A labdane keto-triol **6** quite similar to **3** was obtained [33] after a microbiological transformation of 13*R*,14*R*,15-trihydroxylabd-7-ene **5** (Fig. 3), a diterpen commonly found in *Madia* species [34, 35], as well as in *Blepharizona plumosa* [36]; **5** is a diastereomer of the *ent*-labdan **2** isolated from *G. glutinosum*. As expected, the NMR values of the pseudoenantiomeric labdane keto-triol **6** [33] are very similar to those of **3**. The main difference between both compounds is the chemical shift of C-14 ($\delta_C = 77.2$ in **3**, $\delta_C = 74.9$ in the reported diastereomeric labdane **6**). This seems to be due to a change in the chirality of C-13, which in **2** and **3** is (*S*) but (*R*) in the labdane diterpene from *Madia* species. The configurations on the carbons 13 (*R*) and 14 (*R*) in labdane **6** (Fig. 4) would allow hydrogen bonding between the hydroxyl groups that probably diminishes the electronegative effect of the involved oxygen atoms and might result in increased shielding on these carbons and consequently leads to the high

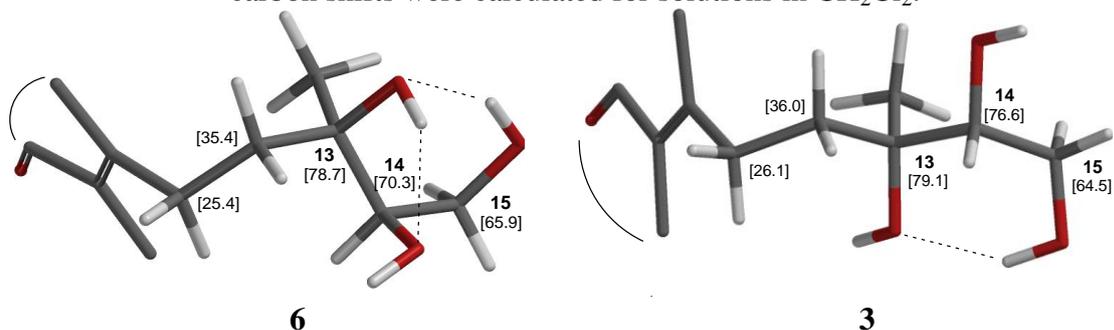
field chemical shift of C-14 ($\delta_C = 74.9$). In *ent*-labdane **3** hydrogen bonding (like in labdane **6**) should be expected preferentially between 13-OH and 15-OH which thus leads to the low field chemical shift of C-14 ($\delta_C = 77.2$). This assumption is nicely confirmed by DFT calculations [47] with predicted shifts close to the experimental values (Fig. 4).

Figure 3. Microbiological transformation of labdane **5** into **6** [33]



There are some differences in the chemical shifts assignments reported by Haridy *et al.* [33] in the ^{13}C NMR spectrum of labdane **6** for the positions 1-3 ($\delta_C = 18.6, 41.3$ and 35.9) in comparison with the signals of our *ent*-labdane **3** ($\delta_C = 35.9, 18.6, 41.2$). The hydrogen and carbon connectivities in **3** were deduced from the ^1H - ^1H COSY, HSQC and HMBC spectra (Fig. 2). The attachment of methyl groups 18 and 19 at C-4 was clearly illustrated by the cross-peak of methyl signals in the HMBC spectrum at $\delta_C = 32.5$ and 21.3 with H-5 represented by a multiplet centered at $\delta_H = 1.67$ and with CH_2 -3 represented by two multiplets at $\delta_H = 1.16$ and 1.40 (HSQC confirms $\delta_C = 41.2$ for C-3). Likewise, the attachment of methyl 20 at C-10 was determined by the cross-peak of the signal at $\delta_C = 18.1$ with H-5 and with CH_2 -1 represented by two multiplets at $\delta_H = 1.27$ and 1.85 ($\delta_C = 35.9$ by HSQC for C-1). Our assignments for the chemical shifts of the methylene groups in the positions 1-3 of compound **3** are in agreement with other literature values reported for the labdane skeleton [24, 31, 32] and are also reproduced by prediction programs like the ACD/CNMR Predictor 89 [48].

Figure 4. Conformations and hydrogen bridges of labdane **6** (left partial structure) and *ent*-labdane **3** (right fragment) according to DFT calculations with SPARTAN[®]. The carbon shifts were calculated for solutions in CH_2Cl_2 .

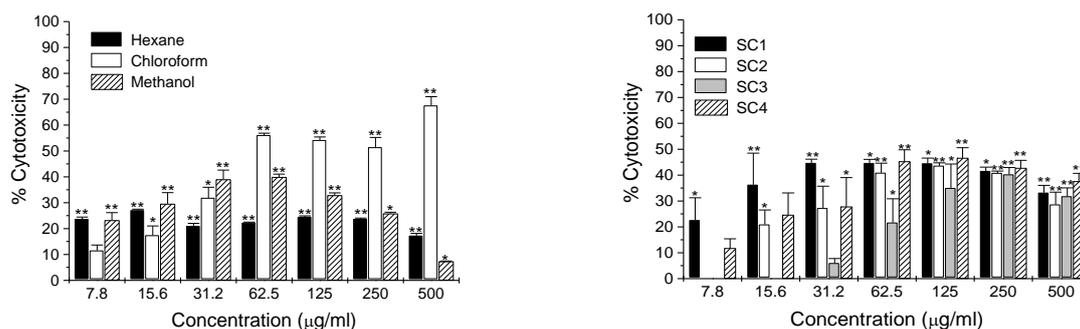


Finally, from the methanol extract of *G. glutinosum*, D-perseitol (**4**), a known naturally occurring heptitol [37, 38], was isolated for the first time from this plant. The physical and optical properties of the isolated perseitol are sufficiently different from the diastereomeric heptitols D-volemitol and D- β -sedoheptitol, isolated from other plants [39, 40].

2.2 Cytotoxicity activity

The cytotoxic activity of the extracts of *G. glutinosum* and compounds **1-4** was determined by using the *in vitro* L5178Y-R lymphoma murine model [27]. Viability of L5178Y-R tumor cells was significantly ($p < 0.05$) reduced by *G. glutinosum* extracts (Fig. 5); hexane and methanol extracts caused significant cytotoxicity of 24 % and 23 %, respectively, at the lowest concentration tested (7.8 $\mu\text{g/mL}$). In addition, fractions SC1 and SC4 obtained from the hexane extract after column chromatography over silica gel, showed the highest cytotoxicity of 45 % and 27 %, respectively, at 31.2 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 5).

Figure 5. Cytotoxicity of extracts and fractions SC1 to SC4 from hexane extract of *Gymnosperma glutinosum* against L5178Y-R cells *in vitro*, as compared with untreated control (culture medium). Data represent means \pm SD of triplicate determinations from 3 independent experiments. Optical density at 540 nm for untreated cells was 0.53 ± 0.06 .

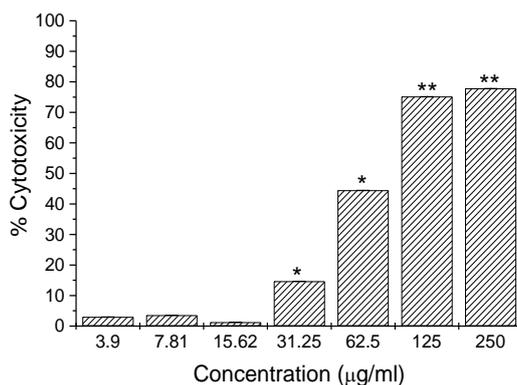


The bioassay guided purification of fractions SC1 and SC4 from the hexanic extract resulted in the isolation and identification of three compounds that were tested for cytotoxic activity against L5178Y-R cells, from which, only compound **2** was observed to be cytotoxic.

Hentriacontane (**1**) and the new *ent*-labdane **3** showed not significant cytotoxicity (up to 33% cytotoxicity; data not shown), whereas the *ent*-labdane **2** showed significant ($p < 0.05$) and concentration-dependent cytotoxicity (up to 78 %)

against L5178Y-R cells at concentrations ranging from 7.8 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 6). The heptitol **4** isolated from the methanolic extract did not show cytotoxicity at any concentration tested.

Figure 6. Cytotoxicity of pure compound **2** from *Gymnosperma glutinosum* against L5178Y-R cells *in vitro*, as compared with untreated control (culture medium). Data represent means \pm SD of triplicate determinations from three independent experiments. Optical density at 540 nm for untreated cells was 0.53 ± 0.06 .



3. Experimental section

3.1. General

Melting points were determined on an Electrothermal 9100 apparatus (Thermoscientific). Optical rotations were recorded on a PolyScience Polarimeter Model SR-6 and on a Perkin Elmer Polarimeter Model 241. IR spectra were recorded on a Varian 1000 FT-IR spectrometer using an ATR accessory. NMR spectra were measured on a Bruker DPX Spectrometer (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz). ESI HR mass spectra were measured on a Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer. EI MS was recorded on a Finnigan MAT 95 spectrometer (70 eV).

TLC was carried out on pre-coated silica gel glass plates 5×10 cm (Merck silica gel 60 F₂₅₄, Darmstadt, Germany). Normal phase column chromatography was performed on silica gel (60-200 mesh) purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Size-exclusion chromatography was performed on Sephadex LH-20 (Lipophilic Sephadex, Amersham Biosciences Ltd; purchased from Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).

3.2. Plant material

Aerial parts of *G. glutinosum* were collected in Escobedo, Nuevo León, México, in July 2003 and identified by Ma. del Consuelo González. A voucher specimen (No.

024247) was deposited at the Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL), Nuevo León, México.

3.3. Extraction and isolation

Ground and dried leaves of *Gymnosperma glutinosum* (200 g) were sequentially extracted by maceration with 1 L *n*-hexane, chloroform and methanol. After filtration, the solvent was removed under reduced pressure to yield 20.5, 39.9 and 39.4 g of extract, respectively. Each extract was analyzed for cytotoxic activity (Fig. 5). The hexane extract, which was more active than the others at low concentrations, was divided into two portions of ca. 10 g and each of them chromatographed on a silica gel (190 g) column (160 × 3 cm) and eluted with stepwise gradients of *n*-hexane-chloroform (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v, each 400 mL), chloroform-ethyl acetate (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v, each 400 mL), and finally with 800 mL methanol. A total of 184 subfractions (50 mL) were collected for each column and combined on the basis of their TLC (*n*-hexane-CHCl₃ 1:1) profiles into four main fractions as follows: subfractions 1-43 SC1 (1.6 g), subfractions 44-78 SC2 (2.6 g), subfractions 79-104 SC3 (2.4 g) and subfractions 105-184 SC4 (5.9 g). These main fractions, containing the non-polar to the more polar compounds, were used for cytotoxicity assays (Fig. 5). Fractions SC1 and SC4 showed the best activity against L5178Y-R and were submitted to additional fractionation. Fraction SC1 was chromatographed again on a silica gel (20 g) column (36 × 2 cm) using a stepwise gradient solvent system consisting of *n*-hexane-chloroform (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v, each 50 mL), chloroform-ethyl acetate (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v, each 50 mL), and finally with 100 mL methanol. A total of 115 subfractions (10 mL) were collected, combined on the basis of their TLC (*n*-hexane-CHCl₃ 1:1) profiles into eight main fractions as follows: A (subfractions 1-6), B (subfractions 7-21), C (subfractions 22-34), D (subfractions 35-40), E (subfractions 41-49), F (subfractions 50-61), G (subfractions 62-70) and H (subfractions 71-115). Fraction A yielded 200 mg hentriacontane (**1**) whereas fractions B to H were still complex mixtures (NMR) of *n*-alkanes and probably diterpenes. Fraction SC4 was also chromatographed on a silica gel (190 g) column (160 × 3 cm) using a stepwise gradient solvent system consisting of chloroform-ethyl acetate (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v, each 400 mL), and finally with 800 mL methanol. A total of 260 subfractions (20 mL) were collected, combined on the basis of their TLC (CHCl₃-EtOAc, 1:1) profiles into six main fractions as follows: I (subfractions 1-36), J (subfractions 37-60), K (subfractions 61-92), L (subfractions 93-143), M (subfractions 143-182) and N (subfractions 183-260). Fraction L produced

almost pure (+)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-*ent*-labd-7-ene (**2**) whereas fraction M rendered (-)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene (**3**). Both diterpenes were subjected to additional purification on a Sephadex LH-20 (50 g) column (160 × 1.5 cm), using MeOH as eluent. For diterpene **2** a total of 240 subfractions (10 mL) were collected and after combining subfractions 17-20, previously purity judged from TLC (CHCl₃-EtOAc, 1:1), 2.5 g of (+)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-*ent*-labd-7-ene (**2**) were obtained. For diterpene **3** only 190 subfractions (10 mL) were collected. From subfractions 14-18, combined on the basis of their TLC (CHCl₃-EtOAc, 1:1) profiles, 600 mg of (-)-13*S*,14*R*,15-trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene (**3**) were obtained.

After cooling, an amorphous precipitate was formed from the methanol extract, which was collected and stirred in 30 mL cold methanol for 24 h. After filtration, 250 mg of D-glycero-D-galacto-heptitol (**4**) were recovered as a white powder.

(-)-13*S*,14*R*,15-Trihydroxy-7-oxo-*ent*-labd-8(9)-ene (**3**): Colorless oil; $R_f = 0.18$ (CHCl₃-EtOAc, 1:1); $[\alpha]_D^{20}$: -16.5 (c 2.0, CHCl₃); IR (ATR): $\nu_{\max} = 3370, 2915, 1710, 1690, 1640, 1462, 1372, 1018, 720 \text{ cm}^{-1}$; ¹H- and ¹³C NMR data in CDCl₃, see Table 1; ESI-MS (+)-mode: $m/z = 361$ [M + Na]⁺, (-)-mode: $m/z = 337$ [M - H]⁻; (+)-ESI HR MS: $m/z = 339.25300$ [M + H]⁺ (calcd. for C₂₀H₃₅O₄: 339.25298).

3.4. Cytotoxicity assay

3.4.1. Reagents and culture medium

Penicillin-streptomycin solution, L-glutamine, and RPMI 1640 medium were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Fetal bovine serum (FBS), sodium dodecyl sulfate (SDS), N,N-dimethylformamide (DMF) and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Vincristine sulfate salt (97.5 %) was obtained from Vintec (Columbia S. A. de C. V., Mexico). Extraction buffer was prepared by dissolving 20% (wt/vol) SDS at 37 °C in a solution of 50% each DMF and demineralized water, and the pH was adjusted to 4.7.

3.4.2. Tumor cell line

The tumor cell line L5178Y-R (mouse DBA/2 lymphoma) was purchased from The American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and was maintained in culture flasks with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, and 0.5% penicillin-streptomycin solution (referred as complete RPMI medium) at 37 °C, in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ in air. Cellular density was kept between 10⁵ and 10⁶ cells/mL.

3.4.3. Cell preparation and culture

The direct *in vitro* activity of extracts, active fractions and pure compounds of *Gymnosperma glutinosum* was carried out by the tetrazolium bromide (MTT) colorimetric technique [27]. Cell cultures were collected, washed three times in RPMI 1640 and adjusted to 5×10^4 cells/mL with RPMI complete medium. One hundred microliters of the cell suspension were then added to flat-bottomed 96-well plates (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA), containing triplicate cultures (100 μ L) of *G. glutinosum* extracts, active fractions or pure compounds at various concentrations as well as positive (vincristine) and negative (culture medium) controls. The plates were then incubated for 44 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Next, 0.5 mg/mL of MTT were added, and the cultures were additionally incubated for 4 h. After this, 100 μ L extraction buffer were added to all wells and plates were incubated for 16 h and optical densities, resulting from dissolved formazan crystals, were then read in a microplate reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at 540 nm. The results were expressed as mean \pm SD of triplicate determinations from a representative experiment. All experiments were repeated at least three times with similar results. Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance. Cytotoxicity percentage was determined as follows:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = 100 - \frac{A_{540} \text{ in } G. \text{ glutinosum} - \text{ treated cells}}{A_{540} \text{ in untreated cells}} \times 100$$

4. Conclusions

Hentriacontane (**1**) has already been suggested as possible antitumor agent [41, 42], however, in our case, it showed not significant 12 % cytotoxicity at 250 μ g/mL (data not shown). The heptitol **4** did not show cytotoxicity at any concentration tested, although a complex with K⁺ ions has been shown to exhibit a potent inhibitory effect on [³H]-leucine incorporation for protein synthesis on Ehrlich ascites tumor cells in mice [38, 43]. Our results showed significant tumor cell toxicity of the apolar *ent*-labdane **2** of up to 78% (250 μ g/mL) in a concentration-dependent fashion, from concentrations as low as 7.8 μ g/mL, as compared with untreated control, which may be an indication of an important antitumor activity (Fig. 6), whereas *ent*-labdane **3** (polar) only caused low but significant ($p=0.05$) 32% cytotoxicity at 250 μ g/mL (data not shown). Vincristine control caused 68% to 81% cytotoxicity at concentrations ranging from 0.49 to 31.25 μ g/mL respectively (data not shown). Cytotoxicity observed by the hexane extract (Fig. 5) may be the result of the additive effect of all labdane-diterpenes in the extract. Separation of the polar (**3**) and apolar diterpene (**2**) shows that probably these compounds have to cross a lipophilic barrier in the lymphoma cell in order to induce cytotoxicity. The polar diterpene **3** is clearly significantly less effective to cross this

barrier and therefore did not show significant cytotoxicity as pure compound. In our study, we decided to fractionate only the hexane extract, which was more active than the others at low concentrations (7.8 µg/mL). The chloroform extract was not successfully fractionated, however, our preliminary findings showed that this extract is a complex mixture of labdane diterpenes (5 singlets between δ 1.7 and 0.7 in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum; [24, 31, 32]) and highly oxygenated flavonoids (signals for aromatic protons and methoxy groups between δ 3.5 and 4.5 in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum [18, 19]; data not shown).

Diterpenes of the labdane type have been reported to have a broad spectrum of biological activities [44]. Many studies have shown that labdane diterpenes exhibit significant cytotoxic and cytostatic effects against leukemic cell lines of human origin and interfere with the biochemical pathways of apoptosis and the cell cycle phases, as well as with the expression of several protooncogenes such as *c-myc* and *bcl-2* [45]. The cytotoxic activity of the *ent*-labdane diterpenes from *G. glutinosum* indicated that natural products from plants might contribute to the pool of novel anticancer drugs for which tumor resistance may not have been developed [46].

Acknowledgements

The authors would like to thank the DAAD (Germany), who financed a stay of R.Q.L. at the University of Göttingen. We also thank the Universidad Autónoma de Nuevo León (México) for PAICYT grants CN892-04, CN1097-05 and CN-1570-07, as well as the CONACYT (Mexico) for grant 52318 to RQL. For the spectroscopic measurements, we thank Dr. H. Frauendorf and Mr. R. Machinek of the University of Göttingen (Germany) and Prof. Noemi Waksman of the College of Medicine from Universidad Autónoma de Nuevo León.

Supporting Information

Supporting Information accompanies this paper.

References and Notes

1. Efferth, T. Cancer therapy with natural products and medicinal plants. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1035-1036.
2. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
3. Newman, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589-2599.

4. Harvey, A.L. Natural products in drug discovery. *Drug. Discov. T.* **2008**, *13*, 894-901.
5. Jesse, W.H.L.; Vederas, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. *Science* **2009**, *325*, 161-165.
6. Alonso-Castro, A.J.; Villarreal, M.L.; Salazar-Olivo, L.A.; Gomez-Sanchez, M.; Dominguez, F.; Garcia-Carranca, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 945-972.
7. Jiménez-Arellanes, M.A.; Cornejo-Garrido, J.; León-Díaz, R. Mexican medicinal plants as a source of antimycobacterial compounds. *Rev. Mex. C. Farm.* **2010**, *41*, 22-29.
8. Navarro-García, V.M.; Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Aviles, M.; Rios, M.Y.; Zepeda, G.; Rojas, M.G. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *87*, 85-88.
9. Heinrich, M. Arzneipflanzen Mexikos. *Deutsche Apotheker Zeitung* **1996**, *136*, 1739-1752.
10. González-Elizondo, M.; López-Enrique, I.L.; González-Elizondo, M.S.; Tena-Flores, J.A. Plantas medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas; Instituto Politécnico Nacional: México, D.F., Mexico, 2004; p. 134.
11. Casas, A.; Valiente-Banuet, A.; Viveros, J.L.; Caballero, J.; Cortés, L.; Dávila, P.; Lira, R.; Rodríguez, I. Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Economic Bot.* **2001**, *55*, 129-166.
12. Valiente-Banuet, A.; Flores-Hernández, N.; Verdú, M.; Dávila, P. The chaparral vegetation in Mexico under non-mediterranean climate: the convergence and Madrean-Tethyan hypotheses reconsidered. *Am. J. Bot.* **1998**, *85*, 1398-1408.
13. Lane, M.A. **Systematics of *Amphiachyris*, *Greenella*, *Gutierrezia*, *Gymnosperma*, *Thurovia* and *Xanthocephalum* (Compositae:Astereae)**. Ph.D. Dissertation, University of Texas, Austin, Texas, 1980.
14. Domínguez, X.A.; Torre, B. Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 1624-1625.
15. Wollenweber, E.; Dietz, V.H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 869-932.
16. Yu, S.; Fang, N.; Mabry, T.J. Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 171-177.
17. Inuma, M.; Mitzuno, M. Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavonones and chalcones. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 681-694.
18. Wollenweber, E.; Dörr, M.; Fritz, H.; Papendieck, S.; Yatskievych, G.; Roitman, J.N. Exudate flavonoids in Asteraceae from Arizona, California and Mexico. *Z. Naturforsch.* **1997**, *52C*, 301-307.

19. Horie, T.; Ohtsuru, Y.; Shibata, K.; Yamashita, K.; Tsukayama, M.; Kawamura, Y. ¹³C NMR Spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 865-874.
20. Miyakado, M.; Ohno, N.; Yosioka, H.; Mabry, T.J.; Whiffin, T. Gymnospermin: a new labdan triol from *Gymnosperma glutinosa*. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 189-190.
21. Martínez, R.; Calderón, J.S.; Toscano, R.A.; Valle-Aguilera, L.; Mendoza-Candelaria, H.M. Ent-neoclerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1505-1507.
22. Maldonado, E.; Segura-Correa, R.; Ortiga, A.; Calderón, J.S.; Fronczek, F.R. Ent-Labdane and neo-Clerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 721-724.
23. Calderón, J.S.; Segura-Correa, R.; Céspedes, C.L.; Toscano, R.A. Crystal and molecular structure of (-)-17-hydroxy-neo-clerod-3-en-15-oic acid from *Gymnosperma glutinosum*. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 1467-1468.
24. Serrano, R.; Hernández, T.; Canales, M.; García-Bores, A.M.; Romo-De-Vivar, A.; Céspedes, C.L.; Avila, J.G. Ent-labdane type diterpene with antifungal activity from *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae). *BLACPMA* **2009**, *8*, 412-418.
25. Canales, M.; Hernández, T.; Serrano, R.; Hernández, L.B.; Duran, A.; Ríos, V.; Sigríst, S.; Hernández, H.L.H.; Garcia, A.M.; Angeles-López, O.; Fernández-Araiza, M.A.; Avila, G. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 343-347.
26. Gomez-Flores, R.; Arzate-Quintana, C.; Quintanilla-Licea, R.; Tamez-Guerra, P.; Tamez-Guerra, R.; Monreal-Cuevas, E.; Rodríguez-Padilla, C. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) Leaf Extracts and Active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. *Am.-Euras. J. Sci. Res.* **2008**, *3*, 188-192.
27. Gomez-Flores, R.; Verástegui-Rodríguez, L.; Quintanilla-Licea, R.; Tamez-Guerra, P.; Monreal-Cuevas, E.; Tamez-Guerra, R.; Rodríguez-Padilla, C. Antitumor Properties of *Gymnosperma glutinosum* Leaf Extracts. *Cancer. Invest.* **2009**, *27*, 149-152.
28. Dargaeva, T.D.; Brutko, L.I. Hentriacontane from *Scabiosa comosa*. *Chem. Nat. Comp.* **1976**, *12*, 471.
29. Tessmann, D.J.; Dianese, J.C. Hentriacontane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* with stimulatory effects on the germination of uredinospores of *Puccinia psidii*. *Fitopatol. Bras.* **2002**, *27*, 538-542.
30. Vardamides, J.C.; Sielinou, V.T.; Ndemangou, B.; Nkengfack, A.E.; Formum, Z.T.; Poumale, H.M.P.; Laatsch, H. Diterpenoids from *Turraeanthus manni*. *Planta Med.* **2007**, *73*, 491-495.

31. Pérez-Castorena, A.L.; Oropeza, R.F.; Vázquez, A.R.; Martínez, M.; Maldonado, E. Labdanes and Withanolides from *Physalis coztomatl*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1029-1033.
32. Lee, S.O.; Choi, S.Z.; Choi, S.U.; Lee, K.C.; Chin, Y.W.; Kim, J.; Kim, Y.C.; Lee, K.R. Labdane diterpenes from *Aster spathulifolius* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1471-1474.
33. Haridy, M.S.A.; Ahmed, A.A.; Doe, M. Microbiological transformation of two labdane diterpenes, the main constituents of *Madia* species, by two fungi. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1455-1459.
34. Bohlmann, F.; Jakupovic, J.; King, R.M.; Robinson, H. New labdane derivatives from *Madia sativa*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1103-1107.
35. Wollenweber, E.; Dörr, M.; Dörsam, M. Flavonoids and terpenoids from the resinous exudates of *Madia* species (Asteaceae, Helenieae). *Z. Naturforsch.* **2003**, *58C*, 153-160.
36. Jolad, S.D.J.; Hoffmann, J.J.; Timmermann, B.N.; Bates, R.B.; Camou, F.A.; McLaughlin, S.P. Diterpenoids and acetogenins of *Blepharizonia plumose*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 905-910.
37. Jones, J.K.N.; Wall, R.A. Isolation of D-Glycero-D-galacto-heptitol from the Wound Exudate of Avocado Trees. *Nature* **1961**, *189*, 746.
38. Ishizu, T.; Winarno, H.; Tsujino, E.; Morita, T.; Shibuya, H. Indonesian Medicinal plants. XXIV. Stereochemical structure of perseitol · K⁺ complex isolated from the leaves of *Scurrula fusca* (Loranthaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 489-492.
39. Richtmeyer, N.K.; Hudson, C.S. The rotation of polyols in ammonium molybdate solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2249-2250.
40. Kanters, J.A.; Schouten, A.; van der Louis, S.; Duisenberg, A.J.M. Structure of D-perseitol (D-glycero-D-galacto-heptitol). *Acta. Cryst.* **1990**, *C46*, 71-74.
41. Takahashi, C.; Kikuchi, N.; Katou, N.; Miki, T.; Yanagida, F.; Umeda, M. Possible anti-tumor-promoting activity of components in Japanese soybean fermented food, Natto: effect of gap junctional intercellular communication. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 471-476.
42. Dias, J.M.M.; Chavez, C.P. Combination of active fractions from the plants *Euphorbia tirucalli* L. and *Ficos carica* L. and methods of treating cancer and aids. *PCT Int. Appl.* **2006**, 2006007676.
43. Kadota, K.; Ogasawara, K.; Iwabuchi, Y. A diastereocontrolled synthesis of perseitol using a dioxabicyclo[3.2.1]octane chiral building block. *Arkivoc* **2003**, 163-170.
44. Chinou, I. Labdanes of natural origin - Biological activities (1981-2004). *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1295-1317.
45. Demetzos, C.; Dimas, K.Z. Labdane-type diterpenes: chemistry and biological activity. In *Studies in Natural Product Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier Science B.V: Amsterdam, Netherlands, 2001; Volume 25, pp. 235-292.

46. Singh, M.; Pal, M.; Sharma, R.P. Biological activity of the labdane diterpenes. *Planta Med.* **1999**, *65*, 2-8.
47. calculated with DFT B3LYP 6-31G* using SPARTAN'08, Wavefunction Inc., Irvine, CA 92612, U.S.A.; <http://www.wavefun.com>.
48. ACD/C+H NMR Predictors, Release 12.00, **2008**, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada.

Sample Availability: Samples of the compounds **1-4** are available from the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).