



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Química

**Determinación del mecanismo anti-inflamatorio  
de peniocerol y chichipegenina aislados de  
*Myrtillocactus geometrizans***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB JUAN RODRIGO SALAZAR

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ



MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO DE QUÍMICA



PDC/Exrad/C.53/Jun/2011

**DR. SIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR, UNAM  
Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, en su reunión 286 del 17 de agosto de 2011, designó el siguiente jurado para examen de DOCTOR EN CIENCIAS de JUAN RODRIGO SALAZAR, con número de cuenta 97536581, con la tesis titulada "DETERMINACIÓN DEL MECANISMO ANTI-INFLAMATORIO DE PENICEROL Y CHICHIPGENINA A SLADOS DE MYRTILLOCACTUS GEOMETRIZANS", dirigida por el Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada  
Secretario: Dr. Mariano Martínez Vázquez  
Vocat: Dra. Tereza Terrazas Saigudo  
Vocat: Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
Vocat: Dr. Marcos Soto Hernández

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, con cinco sinodales, en apego a la nueva normalidad, acogiéndose al artículo QUINTO TRANSITORIO con base a lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, a 17 de agosto de 2011.

  
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA  
COORDINADOR

  
DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁQUEZ  
RESPONSABLE DE LA ENTIDAD

C.C.S. EXPEDIENTE 50770

Teléfono 5629 0171 5623 0170 <http://www.pdqh.unam.mx> Email: pdch@servidor.unam.mx

**Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Mariano Martínez Vázquez.**

**Para la realización de este trabajo, el autor contó con una beca de doctorado otorgada por el CONACyT con número de becario 189980.**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha dado toda mi formación académica profesional y al CONACyT por el apoyo económico otorgado.

Con profundo respeto al Dr. Mariano Martínez Vázquez por sus conocimientos transmitidos y por permitirme trabajar a su lado todos estos años.

Al Dr. Carlos Leonardo A. Céspedes Acuña por haber incentivado el estudio de esta planta y por enseñarme muchas de las alegrías que me han ayudado a formarme como persona.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho por los conocimientos transmitidos y su invaluable ayuda en la realización de las pruebas biológicas.

A Rocío Patiño, Héctor Ríos, Luis Velasco, Nieves Zabala, y Ángeles Peña por la asesoría técnica recibida para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Juan Rodríguez Silverio por permitirme realizar en su laboratorio del Instituto de Enfermedades Respiratorias parte de los experimentos de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Rafael Saavedra Durán y Dr. Javier Espinoza Aguirre por sus constantes aportaciones y su tiempo otorgado.

A los miembros del jurado: Dra. Teresa Terrazas Salgado, Dr. Marcos Soto Hernández, Dr. Manuel Jiménez Estrada y Dr. Alejandro Zentella Dehesa por todos los comentarios y correcciones realizadas al presente trabajo.

## **Dedicatorias**

A mi mamá, María de la Luz Salazar por toda la confianza, ayuda y vida que me has dado. Mi mayor gratitud a tu esfuerzo y dedicación.

A mi esposa Rosa María Barrón Ramos. Cocreadora de la fundación Salazar-Barrón. Cuando iniciamos esta empresa nunca pensamos que este hijo sobre el cual escribo nos costaría tanto trabajo, pero al fin aquí está el resultado. Gracias por permitirme sentir tu amor, confianza, paciencia y apoyo.

A mis hijas, Ana Luisa y María Elena, tengo una deuda con ustedes, fueron muchas tardes y noches que no leí mi parte del cuento, reciban este trabajo compartiendo mi entusiasmo. Mis dos amores, son lo mejor de esta vida.

A Lili por estar siempre con nosotros y ser un ejemplo de constancia.

A mis viejitas queridas, q.e.p.d.

A mis amigos, enormes. Alejandro, Arturo, Carlos, Cesar, Erika, Fabiola, Ivonne, Manuel, Miguel, Pablo, Paty, Víctor. A todos y sus respectivas familias, gracias por compartir momentos de la vida tan lindos.

A la Dra. María de la Luz Obregón, quien con sus charlas y enseñanzas espontáneas, me han ayudado a crecer en la vida.

# Índice

Índice .....	i
Lista de Abreviaturas.....	iv
Lista de Figuras .....	vii
Lista de Tablas.....	ix
Resumen .....	x
Abstract.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Descripción botánica .....	4
II.1. La Familia Cactaceae Juss., 1789 .....	4
II.2. Descripción del género <i>Myrtillocactus</i> Buxb., 1958 .....	5
II.3. Descripción de <i>Myrtillocactus geometrizzans</i> (Martius) Console 1897 .....	7
III. Revisión de la química de la Familia Cactaceae .....	9
III.1. Esteroles .....	11
III.2. Triterpenos .....	15
IV. Antecedentes etnobotánicos de Cactaceae .....	21
IV.1. Etnobotánica de <i>Myrtillocactus geometrizzans</i> .....	23
IV.2. Antecedentes fitoquímicos de <i>Myrtillocactus geometrizzans</i> .....	25
V. La inflamación y el desarrollo del cáncer.....	27
V.1. Aspectos generales del proceso inflamatorio.....	27
V.2. Mediadores de la inflamación.....	29

V.2.1.	Mediadores lipídicos.....	30
V.2.2.	La COX-2 y el papel de los AINEs .....	37
V.3.	Inflamación y cáncer.....	42
VI.	Objetivos.....	48
VI.1.	General .....	48
VI.2.	Particulares.....	48
VII.	Materiales y métodos.....	49
VII.1.	Recolección del material vegetal.....	49
VII.2.	Obtención de extractos .....	49
VII.3.	Fraccionamiento de extractos y purificación de compuestos.....	50
VII.3.1.	Hidrólisis del extracto de metanol de partes aéreas.....	50
VII.3.2.	Cromatografía en capa fina.....	51
VII.3.3.	Cromatografía en columna abierta.....	51
VII.3.4.	Cromatografía en columna rápida (flash) .....	52
VII.3.5.	Cristalización .....	52
VII.3.6.	Determinación del punto de fusión.....	53
VII.4.	Técnicas generales de elucidación estructural .....	54
VII.4.1.	Espectrofotometría Infrarroja.....	54
VII.4.2.	Espectrometría de masas.....	54
VII.4.3.	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.....	54
VII.5.	Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios aislados.....	55
VII.6.	Reacción de acetilación de peniocerol ( <b>12</b> ), macdougallina ( <b>13</b> ) y chichipegenina ( <b>36</b> ) .....	60



VII.7.	Modelos de inflamación in vivo.....	61
VII.7.1.	Animales de laboratorio.....	61
VII.7.2.	Inflamación inducida por 13-acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón .....	61
VII.7.3.	Inflamación inducida por etilfenil-propiolato (EPP) en oreja de ratón.....	64
VII.7.4.	Inflamación inducida por carragenina en pata de rata .....	65
VII.7.5.	Modelo de Hiperalgia inducida por carragenina .....	66
VII.8.	Modelos “in vitro”.....	69
VII.8.1.	Producción del óxido nítrico en macrófagos de ratón .....	69
VII.8.2.	Evaluación de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO).....	71
VII.8.3.	Proliferación de líneas celulares de cáncer humano .....	73
VII.9.	Análisis estadístico.....	75
VIII.	Resultados y discusión.....	76
VIII.1.	Actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos.....	77
VIII.2.	Edema inducido por EPP en oreja de ratón .....	86
VIII.3.	Edema inducido por carragenina en pata de rata.....	89
VIII.4.	Efecto de peniocerol ( <b>12</b> ) en hiperalgia inducida por carragenina.....	95
VIII.5.	Producción del óxido nítrico en macrófagos de ratón .....	100
VIII.6.	Efecto del peniocerol ( <b>12</b> ) en la actividad de la enzima mieloperoxidasa ...	104
VIII.7.	Inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano .....	111
IX.	Conclusiones.....	114
X.	Referencias bibliográficas .....	116
XI.	Anexos .....	144

## Lista de abreviaturas

5-LO	5-Lipooxigenasa
AA	Ácido araquidónico
ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AMP <sub>C</sub>	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora-1
CCF	Cromatografía en capa fina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
COX- 1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50%
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50%
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EPP	Fenilpropiolato de etilo
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EtOH	Etanol
GMP <sub>C</sub>	Guanosín monofosfato cíclico
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico

HTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IEEM	Espectrometría de masa de impacto electrónico
IL-1	Interleucina-1
<i>i</i> -NOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IR	Espectroscopia infrarrojo
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrienos
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MeOH	Metanol
MEP	Máximo efecto posible
Met PA	Extracto de metanol de partes aéreas
Met R	Extracto de metanol de raíces
MEXU	Herbario Nacional de México
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiasol-2-ilo)-2,5-difeniltetrasol
NF-KB	Factor de transcripción kappa B
NK-1	Receptor de neurokinina-1
NMDA	Receptor del ácido N-metil-D-aspártico
ON	Óxido nítrico
PG	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PKC	Proteína cinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>

SRB	Sulforrodamina B
TMB	Clorhidrato de tetrametilbencidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	13-acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoil forbol

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Especies del género <i>Myrtillocactus</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Distribución de las especies mexicanas del género <i>Myrtillocactus</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> <i>Myrtillocactus geometrizans</i> en hábitat en el municipio el Arenal, estado de Hidalgo, México. ....	8
<b>Figura 4.</b> Detalles de la flor, raíces y tallos de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> .....	8
<b>Figura 5.</b> Algunos compuestos nitrogenados aislados de especies de Cactaceae.....	9
<b>Figura 6.</b> Estructuras de los principales metabolitos secundarios de tipo esterol aislados de especies de la familia Cactaceae.....	13
<b>Figura 7.</b> Estructuras de los triterpenos aislados de especies de la tribu Pachycereeae. ....	18
<b>Figura 8.</b> Estructura de ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico, ácido araquidónico (AA).....	30
<b>Figura 9.</b> Estructura de un fosfolípido, y sitio de corte de la PLA <sub>2</sub> . ....	31
<b>Figura 10.</b> Metabolismo del AA. ....	32
<b>Figura 11.</b> Moléculas derivadas de la actividad de COX, y sus funciones. ....	39
<b>Figura 12.</b> Factores de riesgo y los eventos relacionados con el origen, desarrollo y evaluación del cáncer.....	44
<b>Figura 13.</b> Efectos de la actividad de la COX-2 y sus productos en la carcinogénesis.....	46
<b>Figura 14.</b> Estructuras químicas de los metabolitos aislados de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> y sus derivados acetilados. ....	60
<b>Figura 15.</b> Comparación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> .....	83

<b>Figura 16.</b> Estructura de chichipegenina, longispinogenina y $\beta$ -aminina, aislados de diferentes especies de cactáceas. ....	85
<b>Figura 17.</b> Efectos de administración de carragenina a lo largo del tiempo en la región subplantar de la pata de rata. ....	90
<b>Figura 18.</b> Efectos de chichipegenina, peniocerol, macdougallina e indometacina a lo largo del tiempo y a las diferentes dosis evaluadas. ....	93
<b>Figura 19.</b> Efectos de peniocerol y ketorolaco en el modelo de hiperalgesia inducida en pata de rata por carragenina a través del tiempo. ....	97
<b>Figura 20.</b> Porcentaje del Máximo Efecto Posible (MEP) de peniocerol en el modelo de hiperalgesia en pata de rata inducida por carragenina. ....	98
<b>Figura 21.</b> Efectos de aminoguanidina y peniocerol en la producción de óxido nítrico (ON) en cultivos de macrófagos murinos. ....	102
<b>Figura 22.</b> Representación de los eventos moleculares de la actividad catalítica de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y la formación de ácido hipocloroso. ....	106
<b>Figura 23.</b> Efecto de peniocerol en la actividad de la MPO. ....	109

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Distribución de los triterpenos presentes en algunas especies de la tribu Pachycereae. ....	16
<b>Tabla 2.</b> Sustancias evaluadas en el modelo de inflamación inducida por TPA. ....	63
<b>Tabla 3.</b> Efectos de los extractos de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA. ....	79
<b>Tabla 4.</b> Efecto de las sustancias aisladas de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> , sus derivados acetilados e indometacina en el modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por TPA. ....	81
<b>Tabla 5.</b> Efectos de las sustancias aisladas de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> y sus derivados acetilados en el modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por EPP. ....	87
<b>Tabla 6.</b> Efectos de administración de las sustancias aisladas de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> en el modelo de inflamación en pata de rata inducida por carragenina. ....	91
<b>Tabla 7.</b> Efectos de los compuestos aislados de <i>Myrtillocactus geometizans</i> sus derivados acetilados y doxorubicina en la proliferación de líneas celulares de cáncer humano. ....	111

## Resumen

Se obtuvieron los extractos de n-hexano y metanol de las partes aéreas y raíces de la planta medicinal *Myrtillocactus geometrizans*. Los extractos concentrados al vacío se evaluaron para conocer su actividad anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido en oreja de ratón por el 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA). Los extractos activos se fraccionaron mediante cromatografía en columna abierta. El triterpeno de tipo oleano llamado chichipegina se obtuvo a partir del extracto metanólico de partes aéreas, mientras que los esteroides peniocerol y macdougallina se obtuvieron del extracto de metanol de raíz, respectivamente. Los compuestos aislados fueron evaluados en los modelos de edema inducido por: TPA en oreja de ratón, carragenina en pata de rata y propiolato de etilfenilo (EPP) en oreja de ratón, así como también, sus efectos citotóxicos contra líneas celulares de cáncer humano. Todos los compuestos ensayados inhibieron el edema inducido por TPA en una forma dosis-dependiente, con valores de ED<sub>50</sub> que resultaron menores o de igual magnitud a la mostrada por el fármaco de referencia, la indometacina. Entre ellos, peniocerol fue el compuesto más activo. Por otro lado, sólo peniocerol y macdougallina redujeron el edema inducido por carragenina en la pata de rata. Sin embargo, todos los compuestos fueron incapaces de reducir el edema inducido por el EPP. Por el contrario, tanto peniocerol como macdougallina mostraron una inhibición de la proliferación moderada contra varias líneas celulares de cáncer humano, mientras que chichipegina no resultó tóxica. Adicionalmente, el compuesto más activo peniocerol mostró inhibición de la hiperalgesia inducida por carragenina en pata de rata, y también inhibió la actividad de la mieloperoxidasa en el tejido de oreja de ratón inflamado por TPA. Estos resultados indican que los compuestos aislados de *M. geometrizans* poseen propiedades antiinflamatorias y de inhibición de la proliferación de líneas de cáncer humano, los cuales justifican el uso medicinal atribuido a la planta.



## Abstract

The n-hexane and methanol extracts of aerial parts and roots from medicinal plant *Myrtillocactus geometrizans* were obtained. The vacuum-concentrated extracts were assessed for anti-inflammatory activity in the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse ear edema model. The active extracts were fractioned by column chromatography to afford the oleanane-type triterpene chichipegenin from methanolic aerial parts extract, while the sterols peniocerol and macdougallin were isolated from methanolic root extract respectively. The isolated compounds were assessed in TPA-induced mouse ear edema, carrageenan-induced rat paw edema and ethylphenyl propionate (EPP)-induced mouse ear edema models, as well as the anti-proliferative effects against human cancer cell lines in vitro. All tested compounds inhibited TPA-induced edema in a dose-dependent manner, with ED<sub>50</sub> values less than or equal to that shown by indomethacin. Among them, peniocerol was the most active compound. On the other hand, only peniocerol and macdougallin reduced carrageenan-induced rat paw edema. However, all compounds were unable to reduce the edema induced by EPP. In contrast, both peniocerol and macdougallin showed moderate anti-proliferative activity against several human cancer cell lines while chichipegenin was not toxic. Additionally, the most active compound peniocerol showed antihyperalgesic activity when carrageenan was administered into rat paw, and also inhibited myeloperoxidase activity in TPA-inflamed ear tissue. These results indicate that the compounds isolated from *M. geometrizans* possess anti-inflammatory and anti-proliferative properties, and justify the medicinal uses attributed to the plant.

## I. Introducción

Se conoce que las enzimas inducibles *i*-NOS y COX-2 están asociadas a la fisiopatología de ciertos tipos de cánceres humanos, así como a las enfermedades inflamatorias (McCulloch *et al.*, 2006). A pesar de que se conocen tratamientos y fármacos empleados en este tipo de padecimientos, la identificación de compuestos de origen natural que logren suprimir o regular a la baja las funciones de la *i*-NOS y COX-2, o la activación transcripcional del factor NF- $\kappa$ B, puede conducir al descubrimiento de nuevas terapias anti-inflamatorias. Por otro lado, se sabe que la inflamación está estrechamente vinculada a la promoción de ciertos tumores, de tal forma que las sustancias de origen natural con actividad antiinflamatoria podrían ejercer efectos quimiopreventivos en la carcinogénesis (Chun y Surh, 2004). Debido a lo anterior, una estrategia para la búsqueda de nuevos agentes anti-inflamatorios y anti cancerígenos es la bioprospección de la flora medicinal.

Algunas especies de la familia Cactaceae han sido utilizadas como remedios naturales desde muchos siglos atrás en la medicina tradicional mexicana. Por ejemplo, el peyote (*Lophophora williamsii*), ha sido utilizado no sólo como medio de comunicación del hombre al mundo de los espíritus, sino también como analgésico y antirreumático; por otro lado, se ha informado el uso de *Ariocarpus kotschoubeyanus* como un analgésico para los golpes y moretones; asimismo los tallos de *Pachycereus pecten-aboriginum* se han utilizado para curar úlceras gástricas y como apósitos para calmar dolores reumáticos y procesos inflamatorios; por otro lado, se ha informado que los tarahumaras usan el látex de

*Mammillaria heyderi* para el dolor de los oídos y la sordera; y por último se ha informado que partes de *Stenocereus thurberi* se ha utilizado para calmar los dolores en general (Batis y Rojas-Aréchiga, 2002).

A pesar del amplio uso de estas especies, en general la literatura concerniente a la química, actividades biológicas o toxicidad de estos recursos vegetales es escasa. Lo anterior evidencia la carencia de estudios realizados, salvo algunas excepciones, entre las que destacan los realizados con los denominados “nopales” y sus frutos llamados tunas (*Opuntia* spp.). Por ejemplo, algunas especies del género *Opuntia* han sido utilizados como alimento de alta importancia nutricional (Piga, 2004; Stintzing y Carle, 2005; Mosshammer *et al.*, 2006; Cruz-Hernández y Paredes-López, 2010), además de un amplio uso medicinal (Aguilar y Ramírez, 1996; Taddei-Bringas *et al.*, 1999; Livrea y Tesorierere, 2006; Shedbalkar *et al.*, 2010). Adicionalmente se ha informado de la actividad anti cancerígena, antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, antidiabética entre otras, tanto de extractos de tallos como de frutos de dichas especies, los cuales demostraron tener una buena efectividad en los diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* evaluados (revisado en Feugang *et al.*, 2006).

De las cactáceas mexicanas, las especies columnares también han ocupado un lugar importante en la etnobotánica, y algunas de ellas se han empleado con distintos fines incluyendo el medicinal (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001; Luna-Morales y Aguirre, 2001). De algunas de estas especies vegetales se han aislado compuestos que resultaron activos en modelos de inflamación inducida por agentes químicos como el 13-acetato de

12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA), así mismo, también resultaron activos inhibiendo la proliferación de células tumorales en cultivos *in vitro* (Akihisa y Yasukawa, 2001). Debido a que en un estudio previo de las partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans* se aislaron compuestos similares a aquellos aislados de otras cactáceas con actividad antiinflamatoria y anti-proliferativa (Djerassi *et al.*, 1957), además del uso medicinal informado para la especie (Luna-Morales y Aguirre, 2001), en este trabajo se eligió a esta especie para realizar su estudio fitoquímico con la finalidad de encontrar compuestos de tipo esterol y triterpeno que presenten actividad antiinflamatoria e inhibidora de la proliferación de líneas celulares de algunos tipos de cáncer humano.

## II. Descripción botánica

### II.1. *La Familia Cactaceae Juss., 1789*

La palabra cactácea deriva del griego, “káctos”, utilizado en la antigüedad para nombrar una especie de cardo espinoso, posiblemente el cardo *Cynara cardunculus* (Asteraceae), siendo utilizada como nombre genérico por Carlos Linneo en 1753, para agrupar a plantas de diversos géneros de la familia Cactaceae (Reyes, 2009).

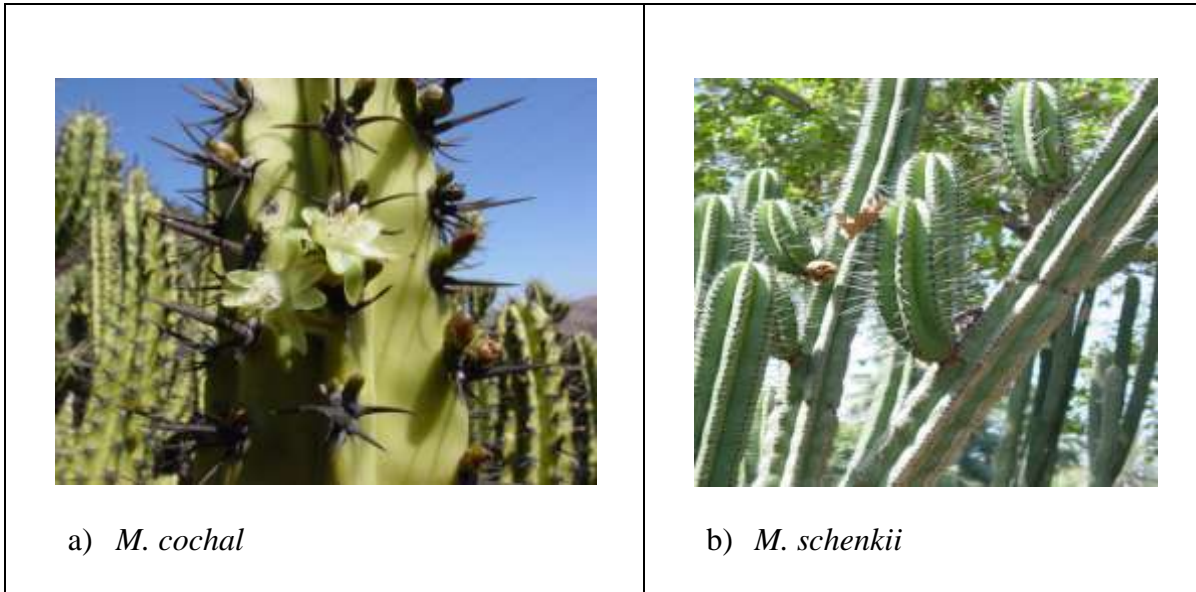
Esta familia, originaria de América, comprende tres subfamilias de plantas perennes: Cactoideae, Opuntioideae y Pereskioideae, agrupa cerca de 1500 especies, de las cuales se estima que en México existen cerca de 700 especies agrupadas en 68 géneros, aunque existe gran variabilidad en estos datos (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001; Guzmán *et al.*, 2007).

La característica más evidente de las cactáceas es la presencia de un órgano denominado areola, considerada como yemas homologas a las yemas axilares de las otras dicotiledóneas. Las yemas de las cactáceas, o aréolas, forman también hojas reducidas, flores, nuevos tallos y además espinas, glóquidas, cerdas y pelos, y a veces raíces adventicias (Bravo-Hollis, 1978).

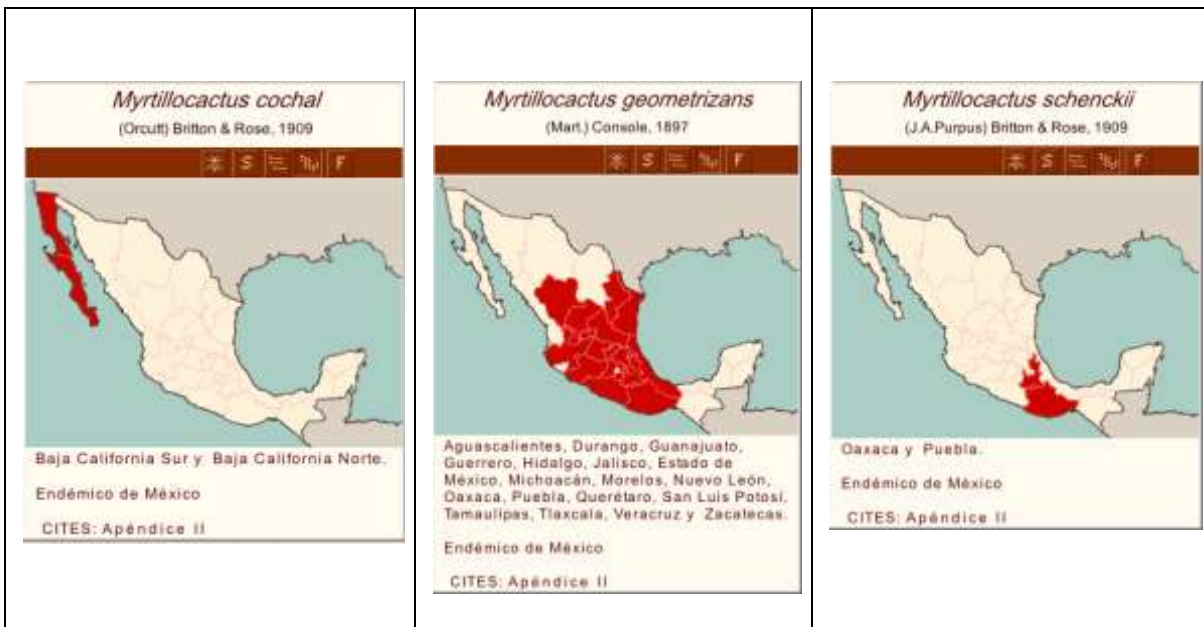
## II.2. Descripción del género *Myrtillocactus* Buxb., 1958

Subfamilia Cactoideae, tribu Pachycereeae. Las especies de *Myrtillocactus* son arborescentes con tronco bien definido, muy ramosas; costillas escasas; areolas grandes con espinas gruesas y más o menos largas; en la época de la floración desarrollan inflorescencias lanosas. Flores hacia la extremidad de las ramas o laterales, varias en cada areola, diurnas, pequeñas, blanco verdosas; pericarpelo globoso, con podarios escasos que llevan escamas muy pequeñas con fieltro escaso; tubo receptacular corto y angosto; cámara nectarial corta y angosta; estambres primarios y secundarios más o menos de la misma longitud; estilo de la misma longitud que los estambres; lóbulos del estigma lineares; cavidad del ovario globosa, con óvulos en funículos ramificados, papilosos; segmentos del perianto escasos, formando un perianto ampliamente abierto. Fruto pequeño, globoso, purpúreo, casi desnudo. Semillas pequeñas, globosas, con testa negro mate, papilosa; hilo casi basal, con micrópilo hundido; embrión curvo, cotiledones anchos.

En cuanto a las especies que integran este género, se reconocen cuatro, distribuidas desde Guatemala (*M. eichlamii* Britton et Rose), pasando por el centro y norte de México. En el centro *M. schenkii* (Purpus) Britton et Rose, mientras *M. geometrizzans* (Martius) Console de más amplia distribución) hasta el altiplano mexicano y sólo en regiones del desierto de Sonora ubicadas en el estado de Baja California se encuentra *M. cochal* (Orcutt) Britton et Rose. En general, se conocen con el nombre común de "garambullos", aunque en cada región adoptan nombres locales (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001).



**Figura 1.** Especies del género *Myrtillocactus*. Tomadas de <http://cactiguide.com>



**Figura 2.** Distribución de las especies mexicanas del género *Myrtillocactus*. Tomado de Ocegueda y Llorente-Bousquets, 2008.

### ***II.3. Descripción de Myrtillocactus geometrizans (Martius)***

#### ***Console 1897***

Árboles de hasta 4 metros de altura. Tronco bien definido, corto; ramificación abundante formando una copa amplia, de hasta 5 metros. Ramas numerosas que a su vez se ramifican, algo encorvadas, de 6 a 10 centímetros de diámetro, de color verde azulado. Costillas 5 o 6, redondeadas, de 2 a 3 centímetros de alto. Areolas distantes entre sí de 1.5 a 3 centímetros, lanosas, prolíferas, a veces creciendo en forma ramificada. Espinas radiales y centrales muy diferentes. Las radiales generalmente 5, a veces 8 ó 9, cortas de 2 a 10 milímetros de largo y en ocasiones hasta de 3 centímetros, rojizas cuando jóvenes, algo aplanadas o hinchadas en la base. La espina central, muy grande, en forma de daga, aplanada lateralmente, de 1 a 7 centímetros de largo, de color negro. Flores en la parte superior de las areolas, pequeñas, de 2.5 a 3.5 centímetros de ancho, color blanco verdoso; varias en la misma areola; segmentos del perianto oblongos, de 1.5 centímetros de longitud, se extienden ampliamente; estambres numerosos, exsertos cuando la flor está bien abierta; lóbulos del estigma 3 a 5. Fruto pequeño, de 1 a 2 centímetros de diámetro, globoso hasta elipsoide, moreno purpúreo, sin espina, comestible. Distribución: desde Tamaulipas hasta Oaxaca, abundan en los mezquitales de los estados del centro de México, especialmente en Querétaro, Hidalgo, Guanajuato, San Luis Potosí; por el Oeste se extienden hasta Durango, Zacatecas, Jalisco y Michoacán (Bravo-Hollis, 1978). En las Figuras 3 y 4 se pueden apreciar características de la especie.





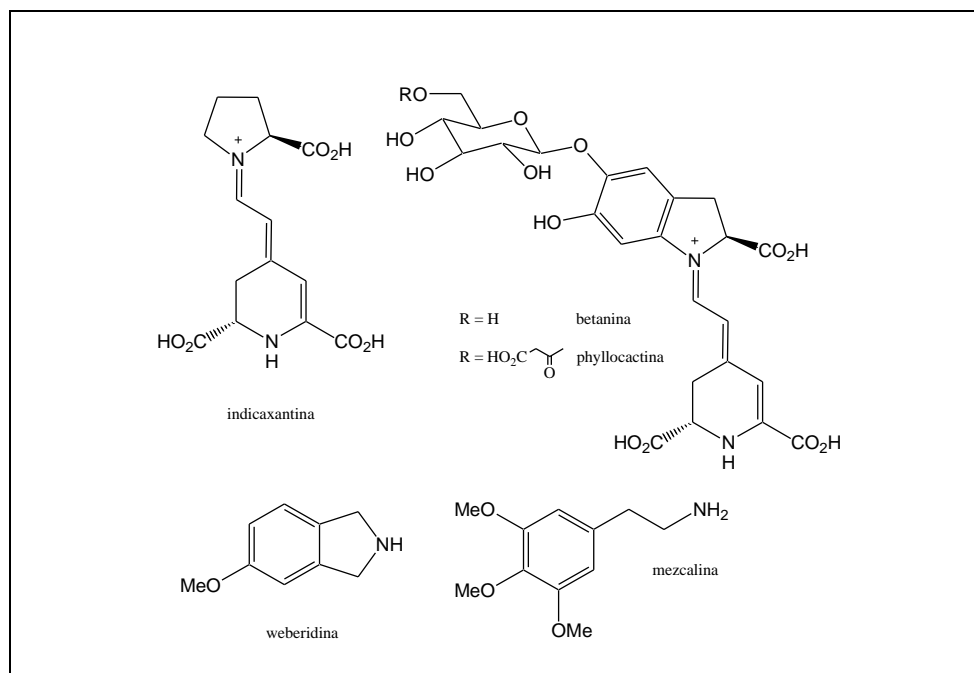
**Figura 3.** *M. geometrizans* en hábitat en el municipio el Arenal, estado de Hidalgo, México. Foto: J.R. Salazar.



**Figura 4.** Detalles de las flores, raíces y tallos de *M. geometrizans*. Foto: J.R. Salazar.

### III. Revisión de la química de la Familia Cactaceae

El orden Caryophyllales, agrupa 12 familias de plantas vasculares y se estima que reúne cerca de 10000 especies (Cronquist, 1968). La familia Cactaceae pertenece a este orden, y conserva una de sus características más representativas, la presencia de betalaínas, pigmentos solubles en agua que contienen uno o varios átomos de nitrógeno, que son acumulados en tejidos como los pétalos de las flores, frutos y en tejido vegetativo (Wybraniec *et al.*, 2001; Stintzing *et al.*, 2002; Castellar *et al.*, 2003; Strack *et al.*, 2003; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). Algunos compuestos representativos pertenecientes a este grupo aislados de algunas especies de la familia se muestran en la Figura 5.



**Figura 5.** Algunos compuestos nitrogenados aislados de especies de Cactaceae.

Por otro lado, también se han aislado de la familia Cactaceae varios flavonoides (Richardson, 1978; Burret *et al.*, 1982; Valente *et al.*, 2010; Moussa-Ayoub *et al.*, 2011) y algunas especies son ricas en alcaloides, cuya presencia explicaría los usos como alucinógenos que la gente da a los tejidos de *Lophophora williamsii* entre otras (Brown *et al.*, 1968; Bruhn y Bruhn, 1973; Flores-Ortiz *et al.*, 2003; Ogunbodede *et al.*, 2010). Además, estas plantas contienen abundantes cantidades de esteroides y triterpenos, los cuales se discutirán más adelante.

### **III.1. Esteroles**

En muy pocas especies de la familia Cactaceae se ha determinado la presencia de esteroles. Con excepción de algunas especies del desierto de Sonora cuya química se ha descrito exhaustivamente (Fogleman *et al.*, 1986; Fogleman y Danielson, 2001), no existen en la literatura suficientes datos para generalizar respecto al tipo y cantidades de esteroles presentes en la familia. Como resultado de una búsqueda exhaustiva, pero por definición siempre incompleta, a continuación se describen algunos de los esteroles aislados de Cactaceae (ver figura 6).

Así, los esteroles lofenol (1), escottenol (2), 24-metilenlofenol (3), latosterol (4), 5 $\alpha$ -campest-7-en-3 $\beta$ -ol (5), espinasterol (6), junto con locereol (7), y 5 $\alpha$ -colest-8, 14-dien-3 $\beta$ -ol (8), fueron aislados de *Lophocereus schottii* (Djerassi, Krakower *et al.*, 1958;. Campbell y Kircher, 1980).

En un estudio posterior, se informó del aislamiento de viperidinona (9), viperidona (10) y deoxiviperidona (11) de *Wilcoxia viperina* (Djerassi *et al.*, 1964; Knight *et al.*, 1966), especie ahora llamada *Peniocereus viperinus* (Arias *et al.*, 2005).

Por otro lado, de *Peniocereus fosterianus* y *P. macdougallii* fueron aislados dos 3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -dihidroxiesteroles, peniocerol (12) y macdougallina (13) respectivamente, junto con pequeñas cantidades de lofenol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol y colesterol (Djerassi *et al.*, 1961.; Djerassi *et al.*, 1963; Djerassi *et al.*, 1965; Knight *et al.*, 1966).

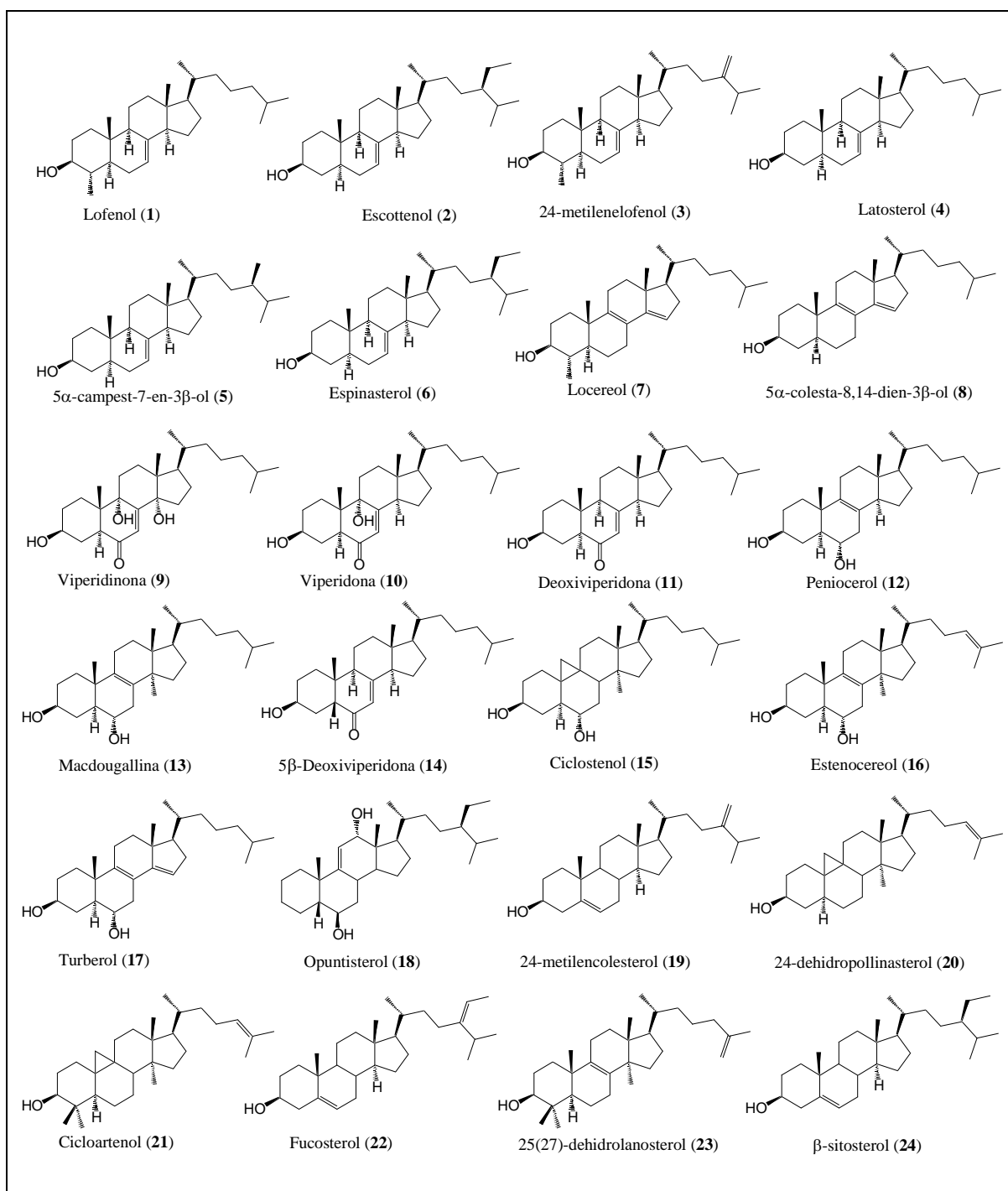
El aislamiento de la macdougallina, un esteroles con un inusual grupo metilo en C-14, motivó el estudio de las raíces de *P. greggii*, con la finalidad de encontrar otros esteroides parecidos, sin embargo, la búsqueda no tuvo éxito, lo que restringe la presencia de dicho esteroles a pocas especies del género *Peniocereus*, hasta donde es posible conocer. Adicionalmente se aisló de esta especie los esteroides: desoxiviperidona, peniocerol, viperidona, viperidinona,  $\beta$ -sitosterol, junto con un nuevo esteroles, el cual presentó una inusual fusión cis entre los anillos A y B del esqueleto de colesterol, a la cual llamaron 5 $\beta$ -desoxyviperidona (14) (Knight y Pettit, 1969).

Por otra parte, de *Stenocereus thurberi* se aislaron pequeñas cantidades de colesterol, campesterol y sitosterol (Kircher, 1980), junto con peniocerol, macdougallina, y tres nuevos 3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -dihidrosteroides ciclostenol (15), estenocereol (16 ) y turberol (17), los dos últimos con un doble enlace en C-8 (Kircher y Bird, 1982).

En otro estudio, Jiang *et al.*, (2006) aislaron un nuevo esteroles de las partes aéreas de *Opuntia dillenii*, al que llamaron opuntisterol (18). Este esteroles presentó la configuración 5 $\beta$ , muy rara en las cactáceas a excepción del compuesto 14, y en general en los esteroides aislados de especies vegetales.

Por último, del polen de *Carnegiea gigantea*, se encontró 24-metilen-colesterol (19) mientras que 24-dehidropollinastanol (20),  $\beta$ -sitosterol, cicloartenol (21), fucosterol (22) entre otros, se encontraron en *Opuntia phaeacantha* y *O. versicolor*, además de 25(27)-

dehidrolanost-8-enol (23) en el polen de *Pachycereus pringlei* (Standifer y Barbier, 1968; Nes y Schmidt, 1988; Lusby *et al.*, 1993).



**Figura 6.** Estructuras de los principales metabolitos secundarios de tipo esterol aislados de especies de la familia Cactaceae.

Con estos datos y otros informados previamente (Salt *et al.*, 1987) se puede inferir que los esteroides encontrados con más frecuencia en la familia son los típicos compuestos C<sub>29</sub> o C<sub>28</sub>, con insaturaciones  $\Delta^5$  como el  $\beta$ -sitosterol (24), campesterol o stigmasterol. Sin embargo, algunas especies contienen esteroides C<sub>27</sub>, con insaturaciones  $\Delta^8$  y con un grupo 6 $\alpha$ -hidroxilo extra como peniocerol, o bien contienen compuestos considerados intermediarios en las rutas biosintéticas “normales” descritas en otros organismos como lofenol o macdougallina, cuya presencia fuertemente sugiere que estas plantas poseen rutas metabólicas modificadas para los esteroides comunes (Knight *et al.*, 1966; Campbell y Kircher, 1980; Schaller, 2003), lo cual constituye un nicho de oportunidad para obtener esteroides novedosos en especies de la familia Cactaceae.

### **III.2. Triterpenos**

A diferencia de los esteroides, los triterpenos son uno de los grupos químicos mejor estudiados de las cactáceas. En muchos casos constituyen los compuestos mayoritarios, presentando una amplia diversidad de modificaciones estructurales, con patrones de oxidación característicos, y una distribución particular en las especies, razones por las que se han utilizado con fines quimiotaxonómicos (Gibson y Horak, 1978). Aunado a lo anterior, muchos de los triterpenos aislados de estas especies vegetales presentan actividades biológicas que van desde sus efectos ecológicos (Fogleman y Armstrong, 1989) hasta efectos en modelos de inflamación y anti-nocicepción (Kinoshita *et al.*, 1998; Akihisa y Yasukawa, 2001), los cuales hace atractiva la investigación de este tipo de compuestos.

Probablemente uno de los primeros estudios realizados con la finalidad de conocer los compuestos presentes en una especie de la familia Cactaceae, fue el realizado hace más de 100 años con *Cereus grandiflorus* (ahora clasificado como *Selenicereus grandiflorus* (Linnaeus) Britton & Rose 1909; Heyl, 1901; Anderson, 2001). Desde entonces existen en la literatura abundantes trabajos referentes a la composición química de especies de Cactaceae.

En este trabajo se presenta una revisión bibliográfica de los triterpenos aislados de la familia Cactaceae, de forma exclusiva en las agliconas ya que se sabe que innumerables triterpenos presentes en los tejidos de las cactáceas están en forma de saponinas. Estas se han logrado aislar de las especies mexicanas y algunas de Centroamérica pertenecientes a la tribu Pachycereeae (Anderson, 2001; Guzmán *et al.*, 2007), a la cual pertenece la cactácea



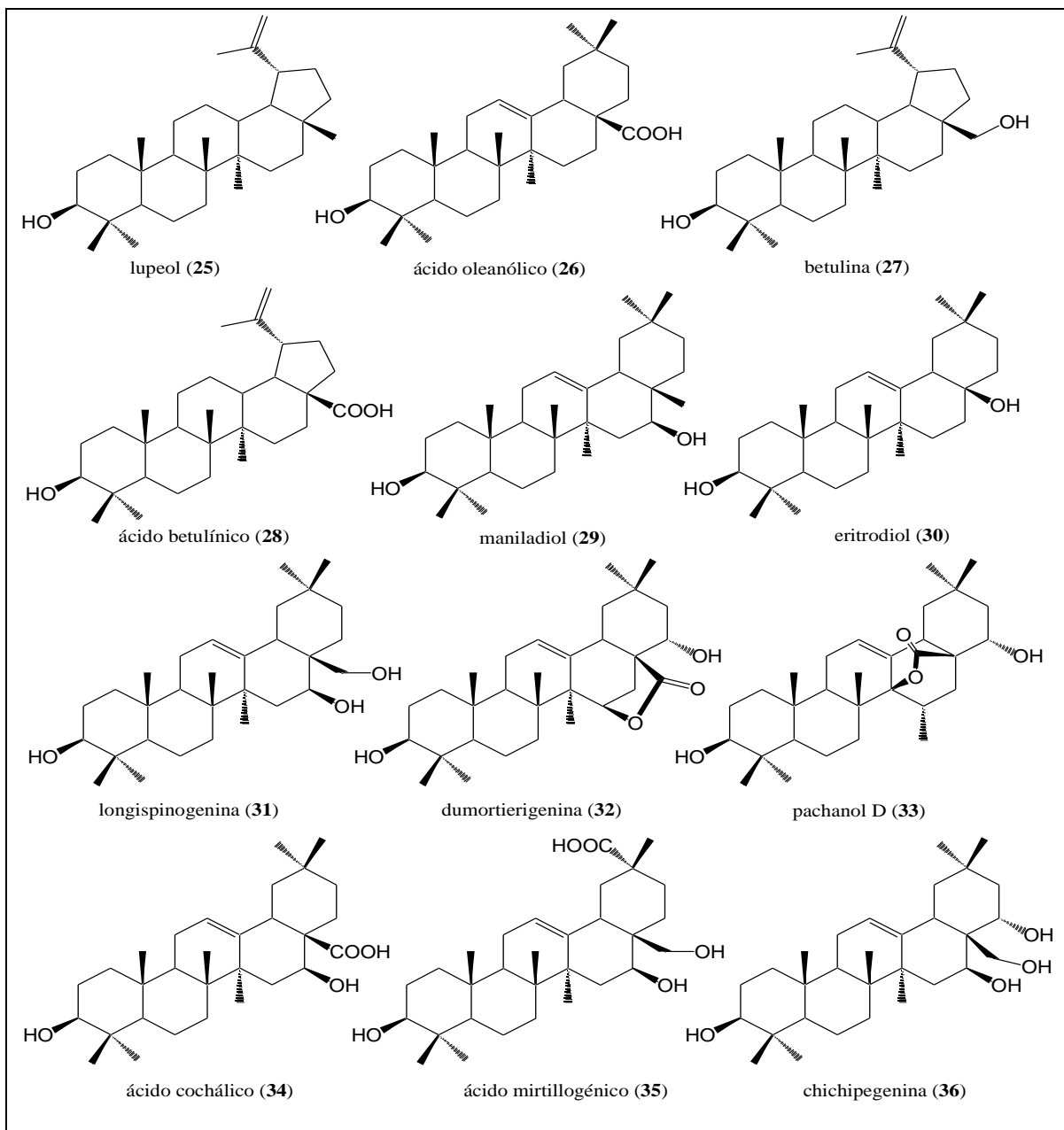
columnar objeto de este estudio. A continuación se mencionan los triterpenos que se han logrado aislar de las especies pertenecientes a esta tribu (ver Tabla 1 y Figura 7).

**Tabla 1.** Distribución de los triterpenos presentes en algunas especies de la tribu Pachycereae que tienen estudios fitoquímicos.

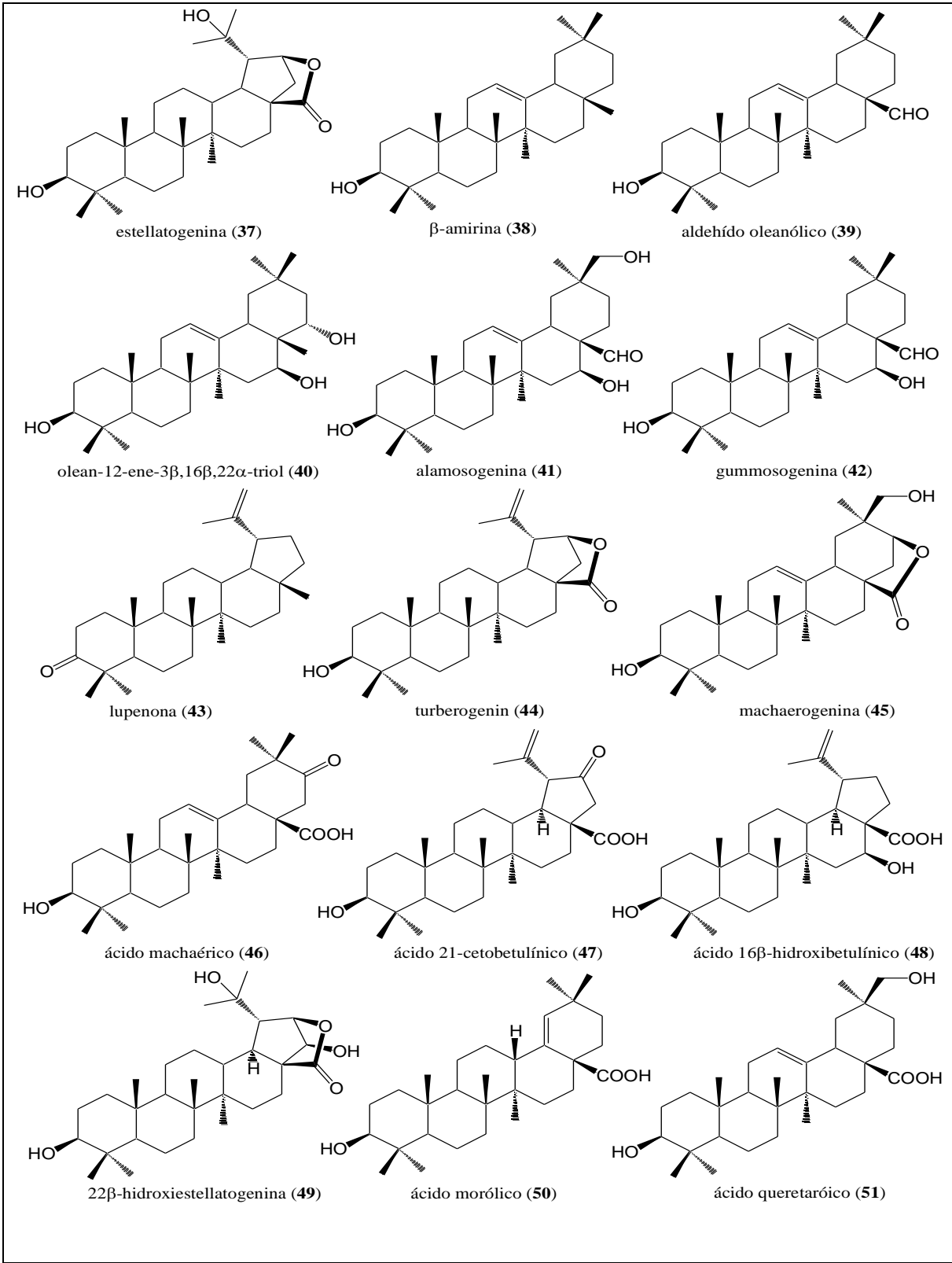
Género	Especie	Triterpeno	Referencia Bibliográfica
<i>Carnegiea</i>	<i>C. gigantea</i> (Engelmann) Hunt 1987	[Polen] 21; 23; 25	Nes y Schmith, 1988
<i>Escontria</i>	<i>E. chiotilla</i> (Weber) Rose 1906	26; 27; 28; 29; 30; 31	Djerassi, Bowers <i>et al.</i> , 1956
<i>Isolatocereus</i>	<i>I. dumortieri</i> (Scheidweiler) Backeberg 1942	32; 33	Djerassi, Farkas <i>et al.</i> , 1954; Djerassi, Robinson <i>et al.</i> , 1956; Kinoshita <i>et al.</i> , 2000
<i>Lemaireocereus</i>	<i>L. hollianus</i> (F.A.C. Weber ex J.M. Coult.) Britton & Rose, 1909 [ <i>Pachycereus hollianus</i> (Weber) Buxbaum 1961]	No se encontraron triterpenos	Djerassi, Bowers <i>et al.</i> , 1956
<i>Lophocereus</i>	<i>L. schotti</i> (Engelmann) Britton & Rose 1909 [ <i>Pachycereus schotti</i> (Engelmann) Hunt 1987]	25	Djerassi, Krakower <i>et al.</i> , 1958 Campbell y Kircher, 1980
<i>Myrtillocactus</i>	<i>M. cochal</i> (Orcutt) Britton & Rose 1909	31; 34; 35; 36	Djerassi, Burstein <i>et al.</i> , 1957; Sandoval <i>et al.</i> , 1957; Djerassi y Thomas, 1954; Djerassi, Thomas <i>et al.</i> , 1955 Djerassi y Monsimer, 1957
	<i>M. geometrizzans</i> (Martius) Console 1897	31; 34; 35; 36	Ídem
	<i>M. eichlamii</i> Britton & Rose 1920	26; 29; 31; 34; 35; 36	Djerassi, Burstein <i>et al.</i> , 1957
	<i>M. schenkii</i> (Purpus) Britton & Rose 1909	26; 37	Djerassi, Burstein <i>et al.</i> , 1957
<i>Pachycereus</i>	<i>P. pringlei</i> (Watson) Britton & Rose 1909	21; 25	Lusby <i>et al.</i> , 1993
	<i>P. weberi</i> (Coulter) Backeberg Weberi	34	Kinoshita <i>et al.</i> , 1998
<i>Peniocereus</i>	<i>P. fosterianus</i> Cutak 1946	36	Djerassi <i>et al.</i> , 1961
	<i>P. macdougallii</i> Cutak 1947	38	Djerassi <i>et al.</i> , 1964
<i>Polaskia</i>	<i>P. chende</i> (R-G) Gibson & Horak 1978	26; 30; 39	Shamma y Rosenstock, 1959
	<i>P. chichipe</i> (Roland-Gosselin) Backeberg 1949	26; 31; 36; 40	Sandoval <i>et al.</i> , 1957; Khong y Lewis, 1975
<i>Stenocereus</i>	<i>S. alamosensis</i> (Coulter) Gibson & Horak 1979	41; 42	Takizawa <i>et al.</i> , 1995
	<i>S. aragonii</i> (Weber) Buxbaum 1961 [Costarica]	Mezcla de amirinas	Djerassi, Liu <i>et al.</i> , 1955
	<i>S. benekei</i> (Ehrenberg) Buxbaum 1961	25; 26; 38; 43, 51	Wolleneber <i>et al.</i> , 1995; Djerassi, Geller <i>et al.</i> , 1953; Djerassi, Henry <i>et al.</i> , 1956
	<i>S. eichlamii</i> (Britton & Rose) Buxbaum 1961	26; 30; 31	Djerassi, McDonald <i>et al.</i> , 1953
	<i>S. eruca</i> (Brandege) Gibson & Horak 1979	26; 28; 37; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53	Djerassi, Liu <i>et al.</i> , 1955; Koyama <i>et al.</i> , 1993; Okazaki <i>et al.</i> , 2007; Ye <i>et al.</i> , 1998
	<i>S. fimbriatus</i> (Lamarck) Lourteig 1991	26; 28; 30; 31	Djerassi y Lippman, 1954
	<i>S. griseus</i> (Haworth) Buxbaum 1961	26; 27; 28; 30; 31	Djerassi, Bowers <i>et al.</i> , 1956
	<i>S. gummosus</i> (Brandege) Gibson & Horak 1978	42; 54; 55	Djerassi, Liu <i>et al.</i> , 1955; Djerassi y lippman, 1955; Djerassi, Geller <i>et al.</i> , 1954
	<i>S. pruinosus</i> (Otto) Buxbaum 1961	26; 30; 31; 56	Djerassi, Liu <i>et al.</i> , 1955; Kinoshita <i>et al.</i> , 1998

Continuación.....

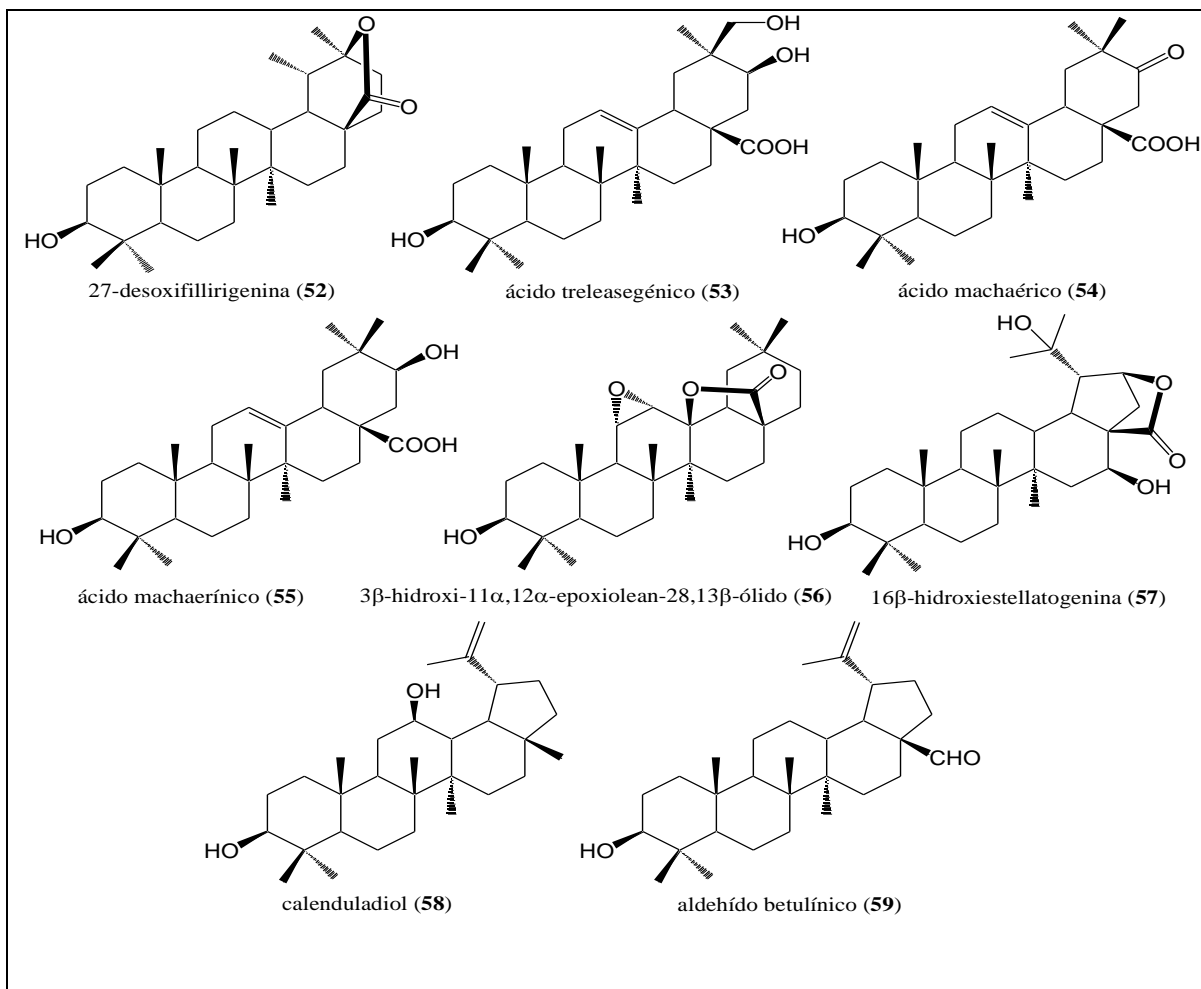
	<i>S. queretaroensis</i> (Weber) Buxbaum 1961	26; 51	Djerassi, Henry <i>et al.</i> , 1956
	<i>S. quevedonis</i> (Ortega) Buxbaum 1961	26; 28; 31	Djerassi, Bowers <i>et al.</i> , 1956
	<i>S. stellatus</i> (Pfeiffer) Riccobono 1909	26; 28; 37; 44; 45; 51; 57	Djerassi, Bowers <i>et al.</i> , 1956; Imai <i>et al.</i> , 2006; Koyama <i>et al.</i> , 1993
	<i>S. thurberi</i> (Engelmann) Buxbaum 1961	25; 26; 27; 29; 30; 31; 38; 39; 44; 51; 58; 59	Djerassi, Geller <i>et al.</i> , 1953; Djerassi, Farkas <i>et al.</i> , 1955; Djerassi, Henry <i>et al.</i> , 1956; Marx <i>et al.</i> , 1967 Jolad y Steelink, 1969; Kasprzyk <i>et al.</i> , 1970; Kircher, 1977; Kircher, 1980
	<i>S. treleasei</i> (Britton & Rose) Backeberg 1960	26; 31; 53	Djerassi, Farkas <i>et al.</i> , 1955; Djerassi y Mills, 1958



**Figura 7.** Estructuras de los triterpenos aislados de especies de la tribu Pachycereae.



Continuación....



Continuación....

Cabe destacar que de los géneros mexicanos: *Acanthocereus*, *Bergerocactus*, *Cephalocereus*, *Echinocereus*, hasta donde sabemos, no existen estudios fitoquímicos o bien, no se han realizado búsquedas específicas de triterpenos, mientras que del género *Neobuxbaumia*, sólo se han buscado alcaloides (Flores-Ortiz *et al.*, 2003) por lo que la presencia de triterpenos en estos géneros podría revisarse con mayor profundidad, principalmente con fines quimiotaxonómicos.

## IV. Antecedentes etnobotánicos de Cactaceae

La relación entre las cactáceas y el hombre ha sido estrecha. En México existen informes en la literatura del uso y aprovechamiento de las cactáceas desde la época prehispánica. Diversas especies se han manejado con fines medicinales, alimenticios, mágico-religiosos, ornamentales entre otros (Bravo-Hollis, 1978; Casas *et al.*, 1999). Debido a estas razones, aunado a los altos niveles de endemismo de las cactáceas mexicanas (Arias, 1993; Hernández y Godínez, 1994), y la presión ecológica creciente, muchas de las especies de esta familia se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, lo que se refleja en el elevado número de especies contenidas en la norma oficial mexicana (NOM-059-ECOL-1994) y en las listas rojas de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES por sus siglas en Inglés).

Sin embargo, otras especies sufren presiones indirectas debido a su lento crecimiento, el uso de sus partes reproductivas como alimentos, y la consecuente incapacidad para regenerar poblaciones, cambios del uso de suelo para agricultura y ganadería (caprino y bovino), o expansión de los asentamientos humanos, otros como el desarrollo industrial, la construcción de caminos y carreteras, los tendidos de líneas eléctricas y telefónicas, la extracción de materiales de construcción, la construcción de presas y sobre todo por la colecta ilegal de ejemplares para el comercio nacional e internacional (Reyes y Terrazas, 1991 como fue citado en Mandujano, *et al.*, 2002; Benítez y Dávila, 2002).

La falta de políticas de conservación adecuadas, aunado a la carencia de suficientes estudios que den cuenta de la importancia ecológica, social, económica, etnobotánica, química y biológica de estas plantas, hacen necesario que se realicen estudios en estas direcciones y con ello se logre generar conocimiento suficiente que permita en un futuro muy cercano proteger tanto las propias cactáceas como los hábitats donde subsisten.

#### **IV.1. Etnobotánica de Myrtillocactus geometrizans**

El uso de esta especie es muy amplio en todos los lugares en donde se localiza. Los arqueólogos han revelado que, junto con varias especies de *Opuntia* y biznagas, las cactáceas columnares, incluyendo *M. geometrizans*, fueron algunos de los principales recursos utilizados por los humanos durante la prehistoria de Mesoamérica. En particular, se pudo determinar la presencia de restos de esta especie en coprolitos humanos de aproximadamente 8500 a 7000 años A.C. (Casas, 2002). El mismo autor menciona que existen estudios que establecen la gran importancia de cactáceas columnares en toda Mesoamérica, incluyendo a *M. geometrizans*, de la cual menciona que los usos de esta especie incluían el consumo de tallos, flores y frutos, el uso de frutos para la preparación de bebidas alcohólicas, como forraje, y como cerco vivo (Casas, 2002).

En la actualidad, en algunas comunidades de Zapotitlán Salinas, Puebla, los frutos se utilizan como alimento fresco, los tallos como alimento forrajero, y como leña, mientras que la planta entera se utiliza como cerca viva (Granados-Sánchez *et al.*, 2004; Paredes *et al.*, 2007). Existen también otras referencias de la comercialización y consumo de los frutos en otros estados del centro de México como Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro, Guanajuato (Mandujano *et al.*, 2002; Hernández-López *et al.*, 2008; Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010) entre otros.

Por otro lado, también está informado el uso de los tallos de esta especie como agente medicinal, en forma de emplastos en la Mixteca baja (Luna-Morales y Aguirre, 2001), así



como también contra fracturas y golpes fuerte, en el municipio de Nicolás Flores, estado de Hidalgo (Sánchez-González *et al.*, 2008). Es importante resaltar que en ambos estudios no se proporciona información detallada de la forma de uso de la especie, sin embargo, durante las recolecciones de la especie realizadas por nuestro grupo en el estado de Hidalgo, los pobladores refirieron conocer el uso de la especie como medicinal (Comunicación Personal).

## **IV.2. Antecedentes Fitoquímicos de Myrtillocactus geometrizans**

La especie *Myrtillocactus geometrizans* ha sido estudiada en diferentes ocasiones, desde los estudios fitoquímicos pioneros de las partes aéreas por parte del grupo del Dr. Carl Djerassi, quienes realizaban la búsqueda de alcaloides y triterpenos (Sandoval *et al.*, 1957). De este primer estudio se concluyó que la especie es negativa para la presencia de alcaloides, y en cambio, resultó ser rica en triterpenos, entre los que se encontraron longispinogenina (**31**), ácido cochálico (**34**), ácido mirtillogénico (**35**) y chichipegenina (**36**) (ver Figura 7).

Posteriormente, en otro estudio fitoquímico de los frutos y de cultivos celulares de tallos se obtuvieron las betalaínas indicaxantina, betanina y fillocactina, las cuales sólo se logran detectar en el cultivo de las células del tallo y no en el tejido íntegro (Colomas *et al.*, 1978). Recientemente, se reportó en el fruto la presencia de las betalaínas portulacaxantina II y III, indicaxantina, vulgaxantina I y III, 3-metoxitiramina-betaxantina, arginina-betaxantina, betanidina, dopa-betaxantina, betanina, y fillocactina (Correa-Betanzo *et al.*, 2010).

En otro estudio, de los tallos y espinas se aislaron los flavonoides quercetina, kaempferol, isorhamnetina (Burret *et al.*, 1982). En un estudio más reciente, de los frutos se logró el aislamiento de los flavonoides epicatequina, epigallocatequina, kaempferol, miricitrina, quercetina 3-O- $\beta$ -D-glucósido, e isorhamnetina 3-O- $\beta$ -D-glucósido (Correa-Betanzo *et al.*, 2010).

Tomando en cuenta el uso medicinal descrito previamente, en conjunto con los metabolitos secundarios aislados de la especie, es posible que alguno de estos compuestos pueda tener actividad antiinflamatoria, por lo que es necesario aislarlos y evaluarlos en los modelos adecuados, para generar conocimiento de la especie y sus compuestos químicos. A continuación se revisará la información más relevante del proceso inflamatorio.

## **V. La inflamación y el desarrollo del cáncer**

### ***V.1. Aspectos generales del proceso inflamatorio***

La inflamación es un proceso fisiológico que presentan los tejidos vascularizados para responder al daño. Durante el proceso inflamatorio, mediadores solubles y componentes celulares colaboran juntos de forma sistemática con la finalidad de destruir, diluir o contener tanto al agente causante del daño, como al tejido dañado. Al término del proceso, su función es la de restituir los procesos fisiológicos normales del tejido.

Desde la antigüedad se conocen los signos clásicos de la inflamación aguda definidos de la siguiente forma por Cornelius Celsus: rubor, calor, dolor, y tumor. Estos signos clínicos de la inflamación son la culminación macroscópica de varios procesos moleculares y celulares, muchos de los cuales hasta fechas recientes se han logrado comprender (Rosenberg y Gallin, 2003).

Tradicionalmente, dependiendo de la duración de la respuesta, la inflamación se clasifica en aguda y crónica. La respuesta inflamatoria aguda es una respuesta rápida, de corta duración (aproximadamente de minutos a días) y relativamente uniforme a un estímulo también agudo, la cual se caracteriza por la acumulación en las inmediaciones del tejido dañado de fluidos, plasma, proteínas, y leucocitos. En contraste, la inflamación crónica es de larga duración e incluye la infiltración de linfocitos y macrófagos en el tejido dañado y el posterior crecimiento de fibroblastos.

Los eventos más importantes que caracterizan ambos eventos son los siguientes:

- I. Un agente que causa daño que ha logrado evadir o destruir las barreras primarias, específicamente células epiteliales o endoteliales y sus estructuras especializadas, y propicia el inicio de la respuesta inflamatoria aguda. Algunos ejemplos de agentes que pueden iniciar una respuesta de este tipo incluyen: neoplasias; patógenos como bacterias, virus o parásitos; la presencia de cuerpos extraños de materiales exógenos como asbestos, o endógenos como cristales de ureato, o complejos inmunes; físicos como golpes, cirugías, ejercicio extremo o fuego; y agentes químicos como los esteres de forbol, carragenina, fenilpropiolato de etilo, formalina, etc.
- II. El daño al tejido desencadena una serie de eventos moleculares que resultan en la producción de mediadores pro-inflamatorios. La acción conjunta de estos mediadores promueven la aparición de los cuatro signos macroscópicos de la inflamación, entre los que se incluyen el incremento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad vascular, la migración de leucocitos desde la sangre periférica a los tejidos, su posterior acumulación en el foco de la inflamación, y su activación con la finalidad en lo posible de destruir y eliminar el agente causal.
- III. Si el agente es eliminado, se producen agentes anti-inflamatorios que toman parte en la respuesta y limitan el daño al tejido circundante del foco de inflamación. Por otro lado, si la destrucción o eliminación del agente no se lleva a cabo, o se realiza de forma incompleta, entonces el proceso inflamatorio persiste y puede llegar a expandirse, utilizando para ello un repertorio aún mayor de mediadores y componentes celulares. Cuando esto sucede, el proceso que ahora cursa se conoce como inflamación crónica y su implicación en procesos patológicos se discutirá más adelante.

## **V.2. *Mediadores de la inflamación***

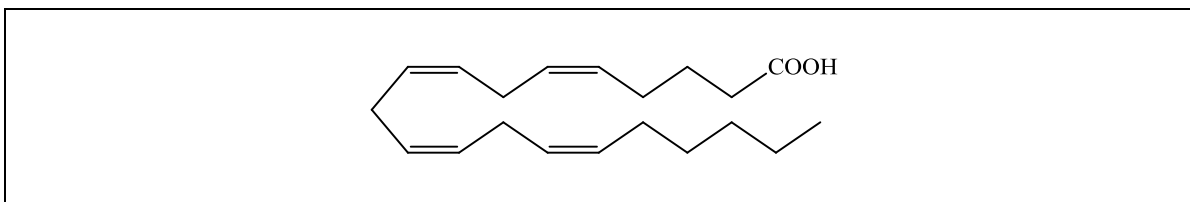
Como se ha mencionado, la inflamación consta de varios eventos celulares y moleculares, los cuales están mediados por distintos tipos de sustancias. Entre estas sustancias podemos mencionar a una amplia variedad de citocinas, las cuales pueden actuar solas o en una red compleja, induciendo la síntesis de una serie de proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio como por ejemplo la proteína-C reactiva, amiloide sérico-A, glicoproteína ácida- $\alpha_1$ , C3 (del complemento), entre otras. Algunas de estas citocinas son interleucina-6, interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), interferón- $\gamma$ , factor transformante de crecimiento- $\beta$ . Estas citocinas pueden ser producidas por diferentes células, entre las cuales se encuentran monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T, y células endoteliales (Kushner y Rzewnicki, 1999).

Otro aspecto importante en el inicio del proceso inflamatorio es la síntesis de derivados del ácido araquidónico, que son llamados mediadores lipídicos, entre ellos las prostaglandinas, cuya producción es estimulada principalmente por IL-1 y TNF- $\alpha$ , y de las cuales, a continuación se discutirán algunos aspectos importantes.

### V.2.1. Mediadores lipídicos

Existen suficientes evidencias que sugieren que los signos cardinales de la inflamación (rubor, dolor, edema y calor) son producidos por la acción de mediadores lipídicos tales como los eicosanoides y el factor activador de plaquetas, que son sintetizados a partir de los fosfolípidos de las membranas de las células inflamatorias.

Los eicosanoides son productos oxigenados de 20 átomos de carbono que derivan del ácido (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-eicosa-5, 8, 11,14-tetraenóico (ácido araquidónico; AA) mostrado en la Figura 8.

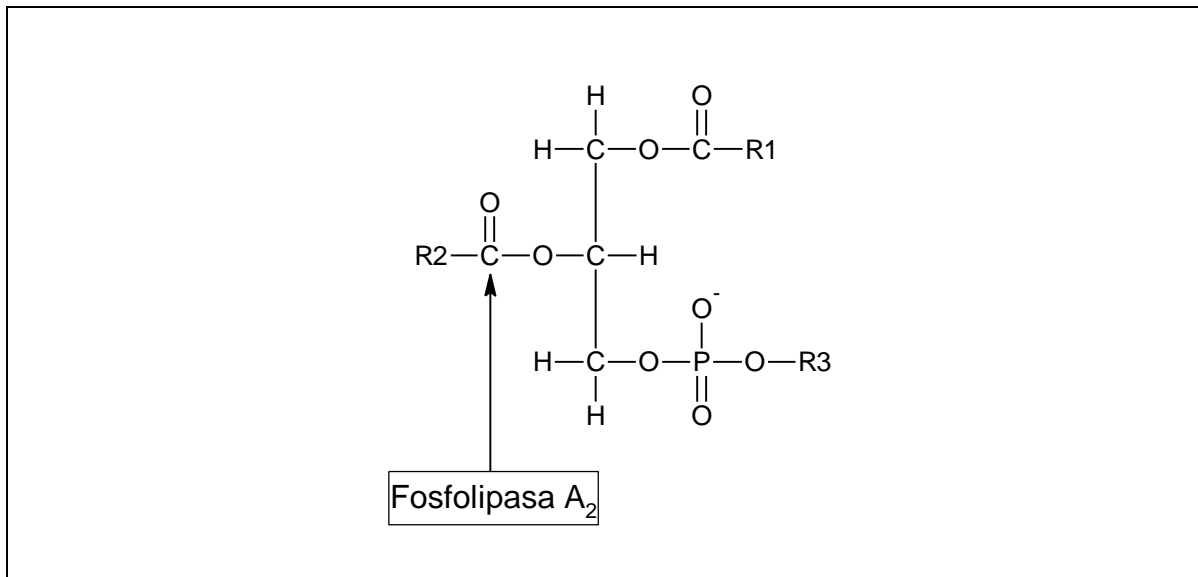


**Figura 8.** Estructura del ácido 5, 8, 11,14-eicosatetraenóico, ácido araquidónico (AA).

El AA se deriva de los alimentos o es sintetizado en el cuerpo a partir del ácido linoléico. El AA se almacena en los lípidos de las membranas celulares, en forma de ésteres en los fosfolípidos, donde se encuentra como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Así, el paso limitante en la síntesis de eicosanoides, es la liberación del AA de los fosfolípidos de la membrana por fosfolipasas específicas, principalmente

fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), lo cual ha sido revisado de forma amplia con anterioridad (Balsinde *et al.*, 1999; Six y Dennis, 2000; Yedgar *et al.*, 2006).

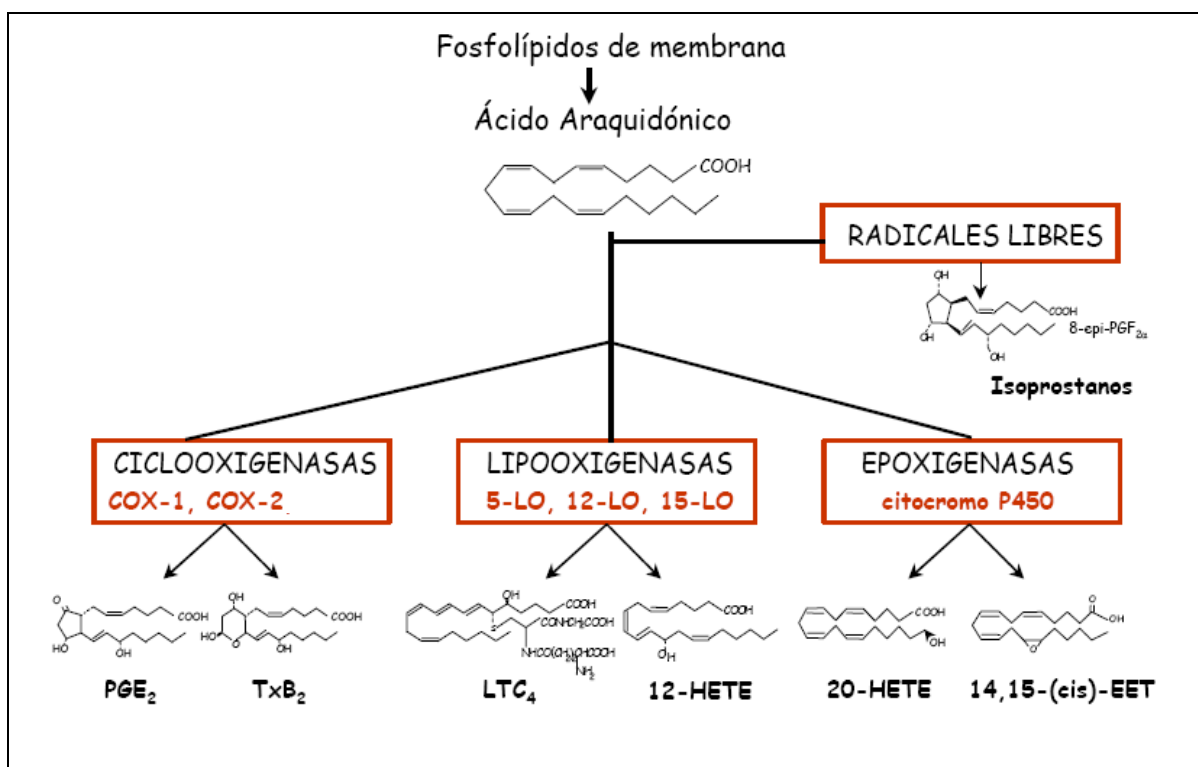
En algunos tipos de células estas enzimas son dependientes de calcio y son activadas por el incremento en la concentración de calcio intracelular. De esta manera, la síntesis de eicosanoides puede iniciarse como ya se mencionó, por una variedad de estímulos que incrementen el nivel de calcio intracelular. Esto ocurre a través de mecanismos de transducción de señales mediados por receptores específicos o a través de la perturbación de la integridad de la membrana celular (trauma físico, químico o inmunológico), los cuales provocan la activación de la PLA<sub>2</sub>, y la consecuente liberación del AA mediante el corte del fosfolípido correspondiente, indicado en la figura 9.



**Figura 9.** Estructura de un fosfolípido, y sitio de corte de la PLA<sub>2</sub>. R2 representa al ácido araquidónico esterificado. Modificado de Laye y Gill, 2003.



Una vez liberado, el AA es oxidado a través de cuatro rutas, produciendo un conjunto de eicosanoides (ver Figura 10). Esta vías son: ruta de las ciclooxigenasas, que generan prostaglandinas y tromboxanos; ruta de las lipooxigenasas, que generan leucotrienos, lipoxinas e hidroxiácidos; vía epoxigenasa P450, que genera epoxiácidos; y por último vía radicales libres (Harizi *et al.*, 2008; Panigrahy *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Metabolismo del AA. Tomado de Titos, 2004.

Las vías de las prostaglandinas y tromboxanos se inician cuando la enzima constitutiva ciclooxigenasa-1 (COX-1), en condiciones normales o en estados patológicos la enzima inducible ciclooxigenasa-2 (COX-2) convierten al AA en el endoperoxido ciclo ( $PGG_2$ ) por

inducción de oxígeno molecular. Esta etapa enzimática puede ser bloqueada irreversiblemente por la aspirina y en forma reversible por otros compuestos anti-inflamatorios no esteroidales (AINEs) tales como la indometacina, cuyos mecanismos e implicaciones se discutirán más adelante.

El segundo endoperoxido cíclico ( $\text{PGH}_2$ ), es generado enzimáticamente a partir de  $\text{PGG}_2$  por reducción del grupo peróxido de C15 a grupo hidroxilo. Como producto de esta reacción se originan grupos oxidantes que regulan la acción de la ciclooxigenasa.

Las prostaglandinas  $\text{PGG}_2$  y  $\text{PGH}_2$ , poseen vida media corta y son metabolizadas rápidamente para dar origen a otros productos. Cuatro de ellos son las prostaglandinas  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_2\alpha$ ,  $\text{PGD}_2$  y  $\text{PGI}_2$ , así como el ácido 12-L heptanóico que es acompañado por malonil aldehído y el tromboxano  $\text{A}_2$ .

La vía de transformación del AA a  $\text{PGH}_2$  es común en todos los sistemas celulares. La metabolización posterior del  $\text{PGH}_2$  depende de la característica de cada célula en particular, de las enzimas que contenga y del balance de algunos cofactores. Así, las plaquetas sanguíneas son ricas en tromboxano sintetasa y producen una mayor parte de tromboxano  $\text{A}_2$ , mientras que en las células del endotelio vascular predomina la prostaciclina sintetasa  $\text{PGI}_2$ . El resto de las prostaglandinas se encuentran difundidas más ampliamente y en mayor o menor proporción son sintetizadas en casi todas las células del organismo (excepto glóbulos rojos y algunos linfocitos).

Las PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, incrementan los niveles de AMPc, que actúa como segundo mensajero. Las prostaglandinas además, pueden influir en el comportamiento celular a través de cambios de las funciones de la membrana, a causa de la alteración de los lípidos, proteínas, composición de las glicoproteínas y por alteraciones en la captación de los nutrientes esenciales e iones, particularmente el ión calcio, por la célula.

Otro prostanoides, PGF<sub>2</sub>α, afecta la síntesis de GMPc, por lo tanto promueve las funciones como proliferación celular, citotoxicidad, producción de linfocinas y formación de linfocitos T.

Como se mencionó, los productos de la oxidación del ácido araquidónico están involucrados en la producción de todos los signos cardinales de la inflamación. La vasodilatación y el enrojecimiento son causados por la liberación de en los tejidos de PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub> y PGD<sub>2</sub> entre otros (Mardini y FitzGerald, 2001).

La cantidad de proteína plasmática exudada de la red microvascular depende de la extensión de la permeabilidad vascular y de la magnitud de la dilatación arteriolar. Las prostaglandinas vasodilatadoras aumentan el diámetro de las arteriolas, dando como resultado una dilatación pasiva de las vénulas por un incremento en la presión hidrostática, contribuyen a potenciar el edema (Griffiths, 1999).

Por otro lado, los leucotrienos (LT) se forman por la actividad de las lipooxigenasas, enzimas que inician la vía de la conversión del ácido araquidónico en hidroperóxidos no

cíclicos, los ácidos hidroxiperoxitetranoicos (HPETE). En los distintos sitios celulares existen lipooxigenasas específicas que dan origen a diversos mediadores lipídicos.

Los leucocitos a partir exclusivamente de 5-HPETE, forman una familia de ácidos 5-hidroxi-eicosatetraenoicos, llamados leucotrienos. La formación de un grupo epoxi en posición 5-6 da origen al LTA<sub>4</sub>. La cual se transforma en LTB<sub>4</sub>. Una vía alternativa de transformación de LTA<sub>4</sub> es mediada por la acción de la glutatión-S-transferasa que cataliza la adición de glutatión, para dar origen al glutatión LTC<sub>4</sub>.

La pérdida posterior del ácido glutámico, es enzimáticamente mediada por la glutamyl-traspeptidasa formando leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>). En forma secuencial el leucotrieno D<sub>4</sub> es convertido en leucotrieno E<sub>4</sub> por acción de una cistenilcinasasa.

Es interesante destacar que en la transformación secuencial del LTC<sub>4</sub>, los productos originales poseen propiedades biológicas cualitativamente comparables, pero la potencia de acción se incrementa con la metabolización, llegando el leucotrieno E<sub>4</sub> a constituirse en el más activo.

Los leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub> son potentes agentes estimulantes de la contracción de la musculatura lisa y de los vasos sanguíneos, sintetizados en diversos tejidos, el pulmón los producen en cantidades considerables, actuando como agentes broncoconstrictores y participando en forma preponderante en la patología del asma. Estos mismos leucotrienos son los principales constituyentes de la sustancia de liberación lenta de anafilaxis.

El leucotrieno B<sub>4</sub> es un mediador natural de la inflamación. Es sintetizado por los leucocitos presentes en el exudado que se produce en el proceso inflamatorio en desarrollo, y sus efectos se asemejan y suplementan a los producidos por el péptido que deriva del complemento C5a, causando aumento en la permeabilidad vascular y formación local de edema. Así las prostaglandinas, el C5a, y el leucotrieno B<sub>4</sub> pueden actuar en forma secuencial y en combinación para producir la permeabilidad vascular y la infiltración celular que caracteriza la respuesta inflamatoria.

Los inhibidores de COX se han usado medicinalmente por más de un siglo, aunque la base biológica para su eficacia se conoció hace unas pocas décadas atrás. Uno de los primeros inhibidores de COX en ser utilizado con fines terapéuticos fue la aspirina, que inhibe la actividad enzimática de la ciclooxigenasa mediante la acetilación irreversible de un residuo de serina en el sitio activo de la enzima (Loll *et al.*, 1995). Debido a la importancia clínica de la inflamación y sus distintas actuaciones dentro de una amplia gama de enfermedades, la quimioterapia de la inflamación se discutirá a continuación.

### V.2.2. La COX-2 y el papel de los AINEs

La prostaglandina G/H sintetasa (COX) cataliza la transformación del AA en el endoperóxido intermedio fundamental la prostaglandina-H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), que sirve como sustrato para la producción de una variedad de prostanoides con diversas acciones biológicas (ver Figura 11). Esta sintetasa es un enzima bifuncional, que posee tanto la actividad de ciclooxygenasa que convierte el AA en PGG<sub>2</sub>, así como actividad de peroxidasa que reduce la PGG<sub>2</sub> para producir PGH<sub>2</sub> (Vane *et al.*, 1998).

Los esfuerzos para identificar y desarrollar nuevos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) aumentaron hace unos años con el descubrimiento de que existen al menos dos isoformas de la COX. La expresión de la isoforma, llamada COX-2, se ha demostrado que puede ser aumentada por lipopolisacárido bacteriano (LPS), citocinas, factores de crecimiento y promotores tumorales, con lo que se distingue fundamentalmente de la expresión constitutiva de la isoforma denominada COX-1 (Xie *et al.*, 1991; Kujubu y Herschman, 1992; O'Banion *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992; Simmons *et al.*, 2004).

Las isoformas COX-1 y COX-2 no solo tienen actividades catalíticas similares, sino que datos cristalográficos también señalan lo similar de sus estructuras terciarias. (Kurumbail, 1996).

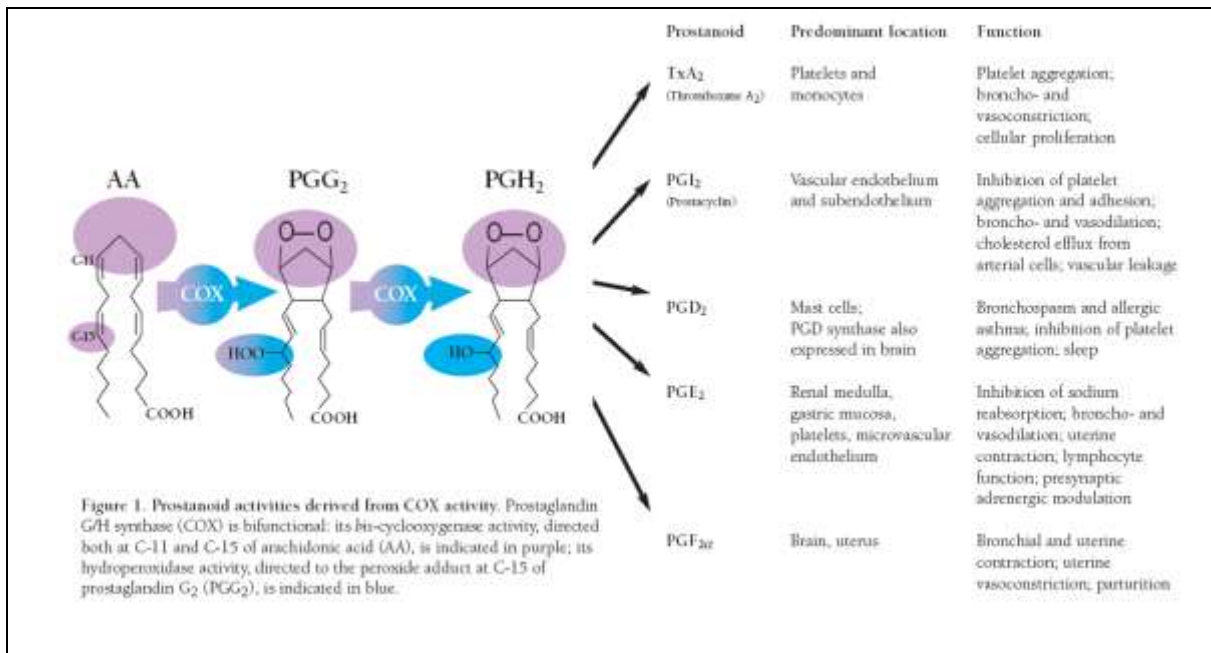
Sin embargo, una mayor flexibilidad del túnel hidrofóbico que conduce al sitio activo, en la COX-2, le confiere a ésta enzima una especificidad de sustrato más amplia. Este túnel

puede influir en el espectro, la cantidad, y/o duración de la producción de prostanoïdes por la COX-2 (Rowlinson *et al.*, 1999). El reconocimiento de estas dos isoformas de la COX ha tenido una de las mayores repercusiones sobre el desarrollo de los AINEs desde la síntesis original de la aspirina a partir del ácido salicílico hace más de un siglo hasta nuestros días. La “hipótesis de la COX-2” propone que en dosis igualmente eficaces, los inhibidores selectivos de la COX-2 causarían menos efectos adversos gastrointestinales graves que aquellos AINEs no selectivos tradicionales.

El desarrollo clínico eficaz para el desarrollo de inhibidores selectivos de la COX-2 puede basarse en dos supuestos: a) la inhibición de la COX-2 es necesario y suficiente para mostrar eficacia analgésica/anti-inflamatoria, y b) la inhibición de COX-1 es en gran medida responsable de la grave toxicidad gastrointestinal de los AINEs convencionales.

Por ejemplo se conoce que los AINEs son ampliamente utilizados para el tratamiento de la artritis y otras enfermedades inflamatorias crónicas. La evidencia derivada de modelos animales de inflamación sugiere que las dosis apropiadas de rofecoxib y celecoxib, dos anti-inflamatorios selectivos a COX-2, logran una eficacia comparable con los AINEs convencionales (Seibert *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1996).

Sin embargo se debe reconocer que la selectividad bioquímica sólo podrá representar uno de los muchos factores que influiría en el resultado clínico de cualquier paciente sometido a tratamiento con un inhibidor selectivo de COX-2.



**Figura 11.** Moléculas derivadas de la actividad de COX, y sus funciones. Tomada de Mardini y FitzGerald, 2001.

Tomando en cuenta lo anterior, se ha establecido que la COX-2 sintetiza prostanoides en estados patológicos como la inflamación y el cáncer (Turini y DuBois, 2002; Chun y Surh, 2004; Wymman y Schneiter, 2008). Además de su regulación a nivel transcripcional por efecto de los glucocorticoides (Kujubu y Herschman, 1992) e inhibición por AINEs selectivos, la actividad de la COX-2 puede verse afectada por citocinas, factores de crecimiento y oncogenes cuya función es prolongar la vida media de transcripción de esta enzima (Sheng *et al.*, 2000). Aunque COX-1 tiene las características estructurales de un gen constitutivo, su expresión no está reprimida en sitios donde la COX-2 está presente (Mardini y FitzGerald, 2001; von Rahden *et al.*, 2005).



La dicotomía de una COX-1 “constitutiva”, con funciones únicamente en condiciones fisiológicas, y una COX-2 “inducible”, produciendo prostanoïdes en estados de enfermedad, es sólo una simplificación de la realidad biológica. Existe evidencia que muestra la expresión de ambas COX-1 y COX-2 aumentada en las articulaciones inflamadas y en la placa aterosclerótica (Crofford *et al.*, 1994; Schonbeck *et al.*, 1999). A pesar de que la COX-2 parece ser la principal fuente de formación de prostaglandinas en la inflamación, hay algunos indicios de que ambas isoformas pueden contribuir en las respuestas inflamatorias agudas (Smith *et al.*, 1998; McAdam *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2007).

Los modelos de ratón en los cuales se han deletado los genes COX, de forma similar presentan algunas discrepancias con la hipótesis de la COX-2. Por ejemplo, tanto el AA como el promotor tumoral 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) inducen la expresión de COX-2 y causan inflamación de la piel en los ratones normales, pero curiosamente, en ratones knock-out para COX-2, se observa el mismo nivel de inflamación inducida en respuesta a AA y TPA (Morham *et al.*, 1995). Por otra parte, la supresión del gen de COX-1 atenúa la respuesta inflamatoria a AA, pero no a TPA (Langenbach *et al.*, 1995).

Lo anterior demuestra que los fármacos selectivos de la COX-2 necesitan estudiarse más a fondo, para comprender el papel de las dos isoformas tanto en los tejidos inflamados, como en los normales, para entonces, diseñar mejores fármacos anti-inflamatorios. También sugiere que no se debe limitar la búsqueda de moléculas de origen natural o

sintético, que inhiban selectivamente la COX-2, para generar nuevas moléculas antiinflamatorias. Otra cuestión importante por resaltar es que al parecer, los resultados obtenidos en ratas no son del todo extrapolables al humano, pues se ha demostrado que a diferencia de la inhabilidad de los anti-inflamatorios selectivos a COX-2 de disminuir completamente la respuesta inflamatoria en ratas, en humanos estos mismos compuestos si tienen un efecto completo (Giuliano y Warner, 2002).

Sin embargo, debido a que algunos prostanoïdes como PGE<sub>2</sub> están implicados en procesos patológicos como el cáncer (Allavena *et al.*, 2008), provengan de la isoforma que provengan, se revisará cuál es la posible relación que existe entre la inflamación y el cáncer.

### **V.3. In inflamación y cáncer**

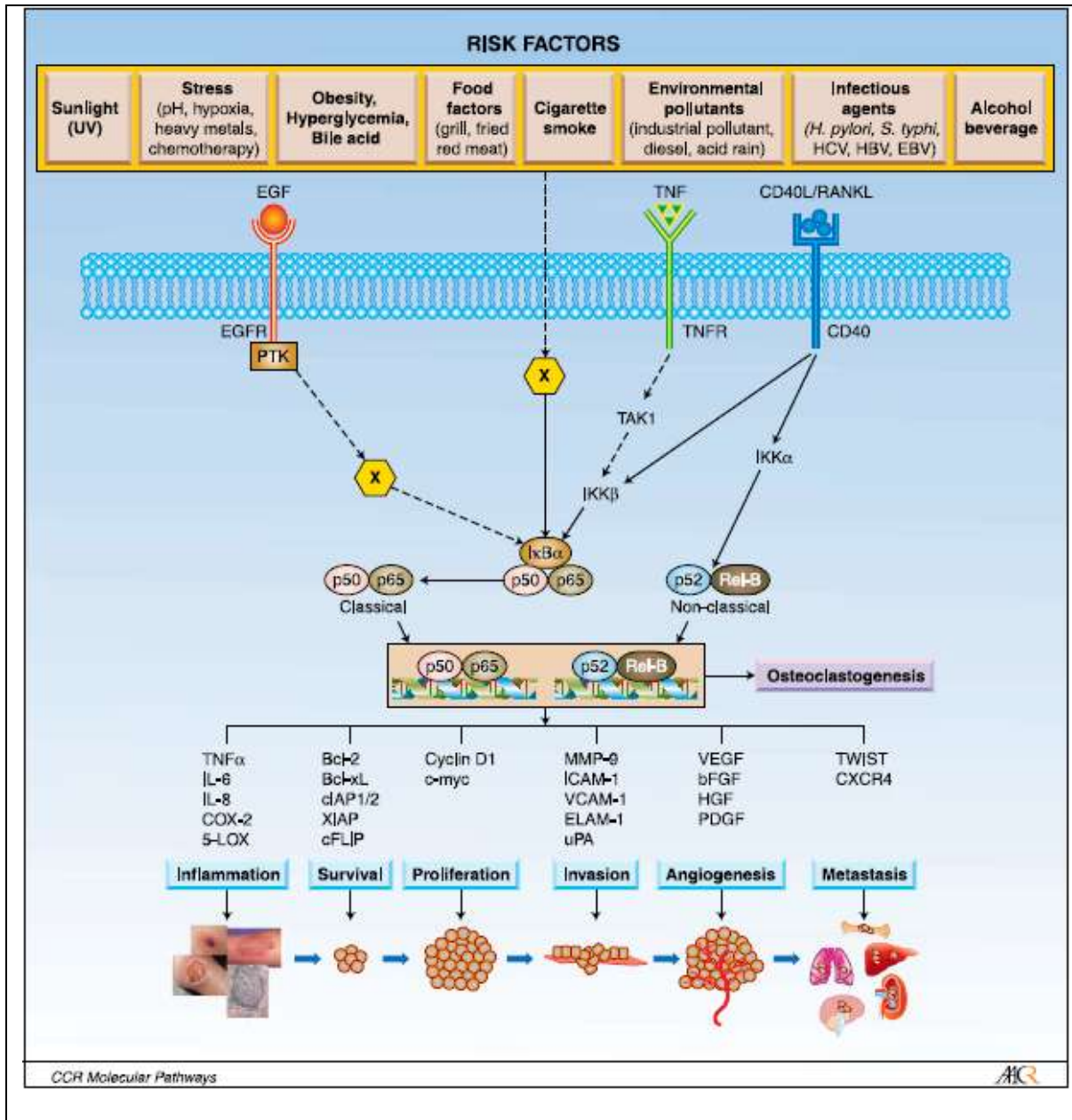
La relación que existe entre un proceso inflamatorio crónico y el cáncer fue propuesta desde 1860, cuando Virchow y colaboradores realizaron observaciones que indicaban que el cáncer se iniciaba en zonas o lugares sometidos a procesos de inflamación crónica.

Existe evidencia creciente de que la inflamación crónica y persistente en los tejidos dañados contribuye a la promoción, la progresión y la metástasis del tumor (Balkwill y Mantovani, 2001; Schwartsburd, 2003; Mantovani *et al.*, 2008; Porta *et al.*, 2009). Así, las células inmunitarias pro-inflamatorias, citocinas, quimiocinas, enzimas como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) o la óxido nítrico sintetasa inducible (*i*-NOS), sus productos, prostaglandinas (por ejemplo, PGE<sub>2</sub>) y el radical gaseoso óxido nítrico (ON), respectivamente, y factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF-*κ*B) se encuentran en niveles aumentados en el microambiente de los tumores (Kundu y Surh, 2008).

Este microambiente pro-inflamatorio potencia la proliferación celular y aumenta el riesgo de desarrollar neoplasias, debido en parte a la liberación de mediadores pro-inflamatorios, factores de crecimiento, presencia de células inflamatorias y agentes que causan daños en el material genético.

Se ha mencionado que el sistema inmune actúa como una “espada de doble filo”, debido a su capacidad de combatir agentes patógenos infecciosos por un lado, y para

producir autoinmunidad en el otro. El sistema inmune también actúa como supresor de tumores por una parte, y como iniciador y/o promotor de tumores en la otra (Balkwill *et al.*, 2005). Varias observaciones clínicas apoyan la idea de una fuerte asociación entre la inflamación crónica y el cáncer (Balkwill *et al.*, 2005; Coussens y Werb, 2002). Por ejemplo, la inflamación crónica inducida en hígado por el virus de la hepatitis C, la infección gástrica por *Helicobacter pylori* y la colitis ulcerosa son importantes factores de riesgo para enfermedades como el carcinoma hepatocelular, el cáncer gástrico y cáncer de colon, respectivamente (Koike, 2005; Roder, 2002).



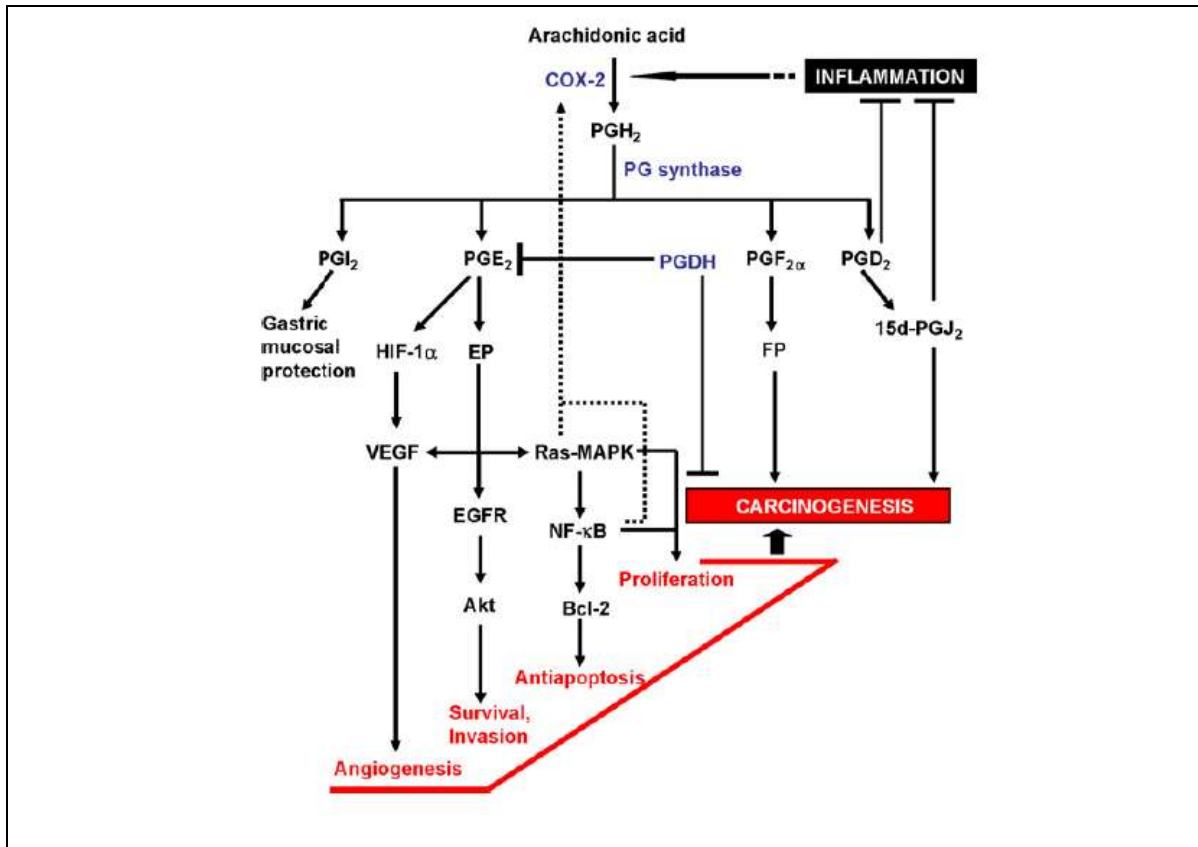
**Figura 12.** Factores de riesgo y los eventos relacionados con el origen, desarrollo y evolución del Cáncer. Tomado de Aggarwal *et al.*, 2009.

El hallazgo de que el uso a largo plazo de AINEs disminuye el riesgo de cáncer (una reducción del 40-50% en el caso de cáncer de colon) fortalece el vínculo propuesto entre la inflamación y el cáncer (Thun *et al.*, 2002). Por otra parte, varias causas no infecciosas de

inflamación crónica (como el humo del cigarrillo, los asbestos y la sílice) también aumentan el riesgo de desarrollar cáncer. Por ejemplo, el mesotelioma pleural maligno se debe principalmente a la inhalación de asbestos (Manning *et al.*, 2002).

Además de los datos epidemiológicos que enlazan la inflamación con el cáncer, los polimorfismos en los genes inflamatorios incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) y los receptores tipo Toll, están asociados con la aparición del linfoma no Hodgkin, cáncer de estómago y de próstata, respectivamente (Karin y Greten, 2005).

Una interpretación simplificada de la carcinogénesis en dos pasos incluye: (i) el proceso conocido como iniciación celular, el cual se debe a la aparición de mutaciones en moléculas que regulan los circuitos celulares del control de la división celular, la supervivencia y senescencia, y (ii) la promoción de las células iniciadas por medio de señales celulares y extracelulares que conduce a la inmortalización de las células que son resistentes a las señales inhibitorias del crecimiento, la apoptosis y la inmunidad antitumoral.



**Figura 13.** Efectos de la actividad de la COX-2 y sus productos en la carcinogénesis. Tomada de Kundu y Surh, 2008.

La inflamación puede contribuir en ambas etapas. Por ejemplo, la inflamación persistente produce daño en los tejidos, lo que resulta en una mayor renovación celular. El ON y especies reactivas de oxígeno (EROs) producidos por células inflamatorias pueden producir daños en el material genético celular, lo que aumenta la posibilidad de la aparición de células que poseen un alto riesgo de transformación maligna (Yoshimura, 2006).

Debido a lo anterior, se ha hipotetizado que una alternativa a los tratamientos tradicionales que están perdiendo su efectividad o que no son específicos y que además son altamente tóxicos, es utilizar algunos de los componentes específicos de la respuesta inflamatoria crónica como posibles dianas terapéuticas para lograr la quimioprevención o la quimioterapia del cáncer (Turini y DuBois, 2002; Laye y Gill, 2003; Chun y Surh, 2004; Dolcet *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2008; Wang y Lin, 2008; Wink *et al.*, 2008; de Souza-Pereira, 2009).

Una de las estrategias que nuestro grupo ha desarrollado para encontrar moléculas activas que puedan ser utilizadas para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer ha sido realizar búsquedas sistemáticas de moléculas presentes en plantas de la flora medicinal utilizada en nuestro país.

Nuestra experiencia (Oviedo-Chavez *et al.*, 2004; Oviedo-Chavez *et al.*, 2005; Flores-Rosete and Martinez-Vazquez, 2008) al igual que la de otros grupos (Recio *et al.*, 1995b; Kinoshita *et al.*, 1998; Akihisa and Yasukawa, 2001; Akihisa *et al.*, 2003; Dzubak *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2007) nos indica que algunos triterpenos y esteroides son buenos candidatos para la búsqueda de compuestos activos que interfieren con el proceso inflamatorio, por lo que en el presente trabajo se utilizó a *M. geometrizans* para la búsqueda de moléculas activas en modelos de inflamación y citotoxicidad, con la finalidad de obtener compuestos candidatos para desarrollar fármacos que ayuden a la quimioprevención o la quimioterapia del cáncer, mediante su interacción con dianas terapéuticas relacionadas con la inflamación, y para ello se desarrolló la metodología descrita a continuación.



## VI. Objetivos

### VI.1. *General*

- Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los extractos y metabolitos secundarios aislados de *Myrtillocactus geometrizans*.

### VI.2. *Particulares*

- Obtener los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol de las partes aéreas y raíces de *Myrtillocactus geometrizans*.
- Evaluar los extractos orgánicos obtenidos en el modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA).
- Aislar, purificar y elucidar la estructura de los principales metabolitos secundarios de tipo triterpeno y esterol presentes en los extractos activos.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de los metabolitos aislados en el modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por: 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA), fenilpropionato de etilo (EPP); en el modelo de inflamación e hiperalgesia en pata de rata inducida por carragenina.
- Determinar la actividad de los metabolitos aislados en la producción de Óxido Nítrico en cultivos de macrófagos murinos; de inhibición de la enzima mieloperoxidasa en oreja de ratón.
- Evaluar los metabolitos secundarios aislados en cultivos de células de cáncer humano para determinar la inhibición de la proliferación celular.

## **VII. Materiales y métodos**

### ***VII.1. Recolección del Material vegetal***

Se realizaron dos colectas de las partes aéreas y raíces de *M. geometrizzans*, la primera se efectuó en el municipio de Ixmiquilpan, estado de Hidalgo, cerca del Km 65 de la carretera Federal México-Laredo en octubre de 2002, y la segunda fue en los alrededores de la estación de Ferrocarril “Bernal” a tres Km de Tequisquiapan, estado de Querétaro, en noviembre del mismo año. Muestras del material vegetal de cada recolecta se depositaron en el Herbario Nacional de México (MEXU), donde fueron identificadas como *M. geometrizzans*, con números de registro MEXU-1075998 y -1075999 respectivamente.

### ***VII.2. Obtención de extractos***

Las partes aéreas de ambas recolecciones fueron combinadas, cortadas en rodajas, secadas a temperatura ambiente y molidas para obtener 1700 g de material vegetal en polvo. Este polvo se extrajo de forma exhaustiva con hexano dos veces por una semana. Después de este tiempo, el líquido se filtró y concentró al vacío en un rotavapor (Buchi 100) para obtener 17 g de extracto de hexano de color marrón y de consistencia viscosa (HexPA). Al término, el material vegetal se secó en la campana de extracción y se extrajo de forma similar con metanol para obtener 62 g de extracto de metanol de color verde oscuro de consistencia viscosa (MetPA).

Por otro lado, las raíces se fragmentaron para obtener 1600 g de material vegetal. Este material se extrajo exhaustivamente con hexano dos veces por una semana, al término de este tiempo se procedió de forma similar a las partes aéreas, para obtener 9 g de extracto de hexano (HexR). Se continuó la extracción con una mezcla de diclorometano y metanol (1:1, v/v) dos veces por una semana. Al término de este tiempo, el líquido se filtró y separó en la fase de diclorometano y de metanol. Ambas fases por separado, se concentraron al vacío para obtener 19 g del extracto de diclorometano (DicR) y 93 g del extracto de metanol (MetR).

### ***VII.3. Fraccionamiento de extractos y purificación de compuestos***

#### **VII.3.1. Hidrólisis del extracto de metanol de partes aéreas.**

Se disolvieron 40 g del extracto MetPA en 500 mL de una mezcla metanol-agua (90% v/v), a esta solución se le adiciono 100 mL de HCl concentrado y la mezcla se calentó a reflujo por 24 horas. Al término del tiempo, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 7 con bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 7.3 g de un residuo café viscoso (HMetPA).

### **VII.3.2. Cromatografía en capa fina**

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron en cromatofolios de aluminio cubiertos de gel de sílice G-200, UV 254 (Merk), de 0.2 mm de espesor y fluorescente. Como reveladores se emplearon una lámpara de luz ultravioleta de 254 y 365 nm (Cole Palmer 9815 series Lamps); y una disolución de sulfato cérico al 1 % (p/v) en ácido sulfúrico 2 N aplicada sobre la superficie de la placa y posteriormente calentada.

### **VII.3.3. Cromatografía en columna abierta**

#### Procedimiento General

Las muestras se disolvieron en la mínima cantidad del disolvente adecuado, hasta total disolución y se añadió gel de sílice en proporción 1:3. Cada mezcla se concentró en rotavapor hasta sequedad. Una vez seca, se depositó en la parte superior de la columna. Dependiendo de la muestra a separar se utilizaron columnas de vidrio de diferentes volúmenes, las cuales fueron empacadas con gel de sílice 60 Ahigram Sil G, kiesel, malla 70-230 (Merk) como fase estacionaria. Para desarrollar la cromatografía se utilizaron mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad (hexano-acetato de etilo-metanol). Se recolectaron fracciones de 50-200 mL, se eliminó la fase móvil en rotavapor y las fracciones concentradas se colectaron en frascos viales de vidrio. Se monitoreó el desarrollo de la cromatografía por CCF revelada con luz U.V. y sulfato cérico en ácido sulfúrico, y se reunieron aquellas que presentaron similitud cromatográfica.

#### **VII.3.4. Cromatografía en columna rápida (flash)**

Se utilizaron columnas de diferentes volúmenes, que contienen en la parte inferior una placa porosa de fibra de vidrio. Se acopló a un matraz kitasato con salida a vacío. La fase estacionaria utilizada fue gel de sílice 60 H, la cual se empaco de forma uniforme, posteriormente se aplicó vacío y el adsorbente se comprimió manualmente. Una vez empaquetada la fase estacionaria se pasó una cierta cantidad de fase móvil para empaquetar aún más la fase estacionaria. Cuando la fase estacionaria se secó completamente, se introdujo la muestra adsorbida en gel de sílice y seca, depositándola en la superficie del adsorbente. A continuación se añadió la fase móvil y se aplicó vacío. Para desarrollar la cromatografía se utilizaron mezclas de disolventes en orden creciente de polaridad (hexano-acetato de etilo-metanol). Se recogieron fracciones de 50 a 200 mL. Al igual que en el caso anterior, las fracciones se concentraron y depositaron en frascos viales de vidrio. Se monitoreó el desarrollo de la cromatografía por CCF y las que presentaron similitud cromatográfica, se reunieron.

#### **VII.3.5. Cristalización**

Con la finalidad de purificar los productos crudos se cristalizaron utilizando distintas mezclas de disolventes. En la mayoría de los casos se indujo la cristalización por medio del raspado de las paredes de los viales donde se encontraba la muestra con la punta de una espátula. Inmediatamente se formaron los cristales, se filtró la mezcla a vacío y los

precipitados se secaron al vacío a temperatura ambiente, o se secaron en campana de extracción al vacío.

### **VII.3.6. Determinación del punto de fusión**

Los puntos de fusión de los compuestos aislados se determinaron en un equipo Fisher Johns y se informaron en grados centígrados sin corregir.

## ***VII.4. Técnicas generales de elucidación estructural***

### **VII.4.1. Espectrofotometría Infrarroja**

La espectrofotometría de absorción en la región infrarroja (IR) se realizó en un espectrofotómetro Nicolet modelo Magna 750 con la técnica de pastilla de KBr. Las frecuencias máximas de absorción se presentan en  $\text{cm}^{-1}$ .

### **VII.4.2. Espectrometría de masas**

Los experimentos se realizaron en un espectrómetro JEOL JMS AX 505 HA mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV. Los resultados se presentaron como la relación de masa respecto de la carga ( $m/z$ ), junto con los porcentajes de abundancia relativa (% a.r.)

### **VII.4.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear**

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (200, 300 o 500 MHz) y de  $^{13}\text{C}$  (50, 75 o 125 MHz) se adquirieron en los equipos Varian-Gemini 200, Varian VXR 300, Eclipse 300, o Bruker-Avance 300; se utilizaron los siguientes disolventes deuterados (Aldrich): cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), dimetil sulfóxido ( $\text{DMSO-}d_6$ ), o metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). El tetrametilsilano (TMS) se utilizó como referencia interna. Los desplazamientos químicos

( $\delta$ ) se expresaron en partes por millón (ppm); la multiplicidad de las señales protónicas se indicaron con las siguientes abreviaturas: s (simple), d (doble), t (triple), dd (doble de dobles), m (múltiple). Las constantes de acoplamiento (J) se indicaron en Hertz (Hz). Cuando fue requerido, se realizaron experimentos adicionales de RMN en una y dos dimensiones, que incluyeron COSY-2D, DEPT- $^{13}\text{C}$ , HETCOR, etc.

## ***VII.5. Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios aislados***

Chichipegenina (**36**): El extracto metanólico crudo de partes aéreas (MetPA; 15 g) se fraccionó en una columna de gel de sílice, eluída con mezclas de hexano / AcOEt / MeOH de polaridad creciente. Tras la concentración a presión reducida, las fracciones que mostraron datos similares de CCF se combinaron. De las fracciones combinadas, eluídas con una mezcla 1:1 (v/v) de hexano-AcOEt se obtuvieron 238 mg de un precipitado de color blanco, con punto de fusión de 321-324 ° C, y una sola mancha en CCF en tres distintos sistemas de elusión. El compuesto aislado es un polvo amorfo, que mostro los siguientes datos espectrales:  $[\alpha]_D^{24} +44^\circ$ . IR  $\nu_{\text{max}}$  3610, 3370, 1650, 1290, 1260, 1190, 1160, 1100, 1060, 1040, 1005, 925  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  0.72 (1H, m, H-5), 0.78 (3H, s, H-24), 0.93 (3H, s, H-25), 0.95 (6H, s, H-29 y H-30), 0.98 (1H, m, H-1a), 0.99 (3H, s, H-23), 1.00 (3H, s, H-26), 1.05 (1H, m, H-19a), 1.24 (3H, s, H-27), 1.32 (1H, m, H-7a), 1.34 (1H, m, H-15a), 1.42 (1H, m, H-6a), 1.52 (1H, m, H-9), 1.54 (1H, m, H-15b), 1.55 (1H, m, H-6b), 1.56 (1H, m, H-21a), 1.58 (2H, m, H<sub>2</sub>-2), 1.61 (1H, m, H-1b), 1.67 (1H, m,



H-21b), 1.73 (1H, m, H-19b), 1.75 (1H, m, H-7b), 1.88 (2H, m, H<sub>2</sub>-11), 2.32 (1H, dd,  $J=14.0, 4.5$  Hz, H-18), 3.17 (1H, m, H-3), 3.52, 4.08 (2H, ABq,  $J_{AB}=11.5$  Hz, H<sub>2</sub>-28), 4.19 (1H, dd,  $J=13.0, 4.5$  Hz, H-22), 4.64 (1H, dd,  $J=12.0, 5.5$  Hz, H-16), 5.28 (1H, t-like, H-12). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  14.95 (C-25), 15.18 (C-24), 16.12 (C-26), 17.74 (C-6), 22.93 (C-11), 24.34 (C-30), 26.59 (C-2), 26.77 (C-27), 27.62 (C-23), 31.83 (C-15), 31.84 (C-20), 32.70 (C-29), 34.43 (C-7), 36.19 (C-10), 38.06 (C-1), 38.20 (C-8), 39.34 (C-4), 41.83 (C-14), 41.99 (C-21), 42.91 (C-18), 43.46 (C-17), 45.11 (C-19), 46.16 (C-9), 54.58 (C-5), 62.39 (C-28), 66.48 (C-16), 71.54 (C-22), 77.75 (C-3), 122.63 (C-12), 141.20 (C-13). IEEM  $m/z$  456 (14) [M<sup>+</sup>], 438 (50), 248 (28), 217 (100), 199 (45), 173 (28). La comparación de estos datos espectrales con aquellos informados en la literatura permitió identificar este compuesto como Chichipegina (**36**), mostrada en la Figura 14 (Sandoval *et al.*, 1957; Khong y Lewis, 1975; Yoshikawa *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2001). Además, 298 mg de **36** se obtuvieron del fraccionamiento en columna de gel de sílice de la mezcla de reacción de hidrólisis ácida del extracto de metanol crudo de partes aéreas (HMetPA; 5 g) en las mismas condiciones descritas anteriormente. Ver Anexo 2.

Peniocerol (**12**): El extracto metanólico crudo de la raíz (MetR; 30 g) se sometió a fraccionamiento en columna de gel de sílice eluyendo con mezclas de hexano / AcOEt / MeOH de polaridad creciente. Las fracciones que mostraron datos similares en CCF se combinaron y se sometieron a una nueva separación en columna empacada con sílice la cual fue eluída con mezclas de hexano-AcOEt de polaridad creciente. De las fracciones eluídas con una mezcla 55:45 (v/v) se formó un precipitado que resultó una mezcla de dos componentes principales (FEMetR, 7.96 g). De la cristalización repetida de esta mezcla, a

partir de metanol, se logró obtener 3.67 g de un sólido cristalino incoloro, con punto de fusión de 179-181 °C. IR  $\nu_{\max}$  3375, 2951, 2869, 1465, 1376, 1129, 1048  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  0.60 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H-26), 0.87 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H-27), 0.88 (2H, m, H<sub>2</sub>-23), 0.91 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 0.95 (2H, m, H<sub>2</sub>-22), 0.97 (3H, s, H-19), 1.10 (2H, m, H<sub>2</sub>-24), 1.12 (2H, m, H<sub>2</sub>-15), 1.13 (1H, m, H-20), 1.14 (1H, m, H-17), 1.29 (2H, m, H<sub>2</sub>-16), 1.32 (2H, m, H<sub>2</sub>-12), 1.39 (1H, m, H-5), 1.48 (1H, m, H-25), 1.69 (2H, m, H<sub>2</sub>-1), 1.83 (2H, m, H<sub>2</sub>-2), 2.06 (2H, m, H-11), 2.16 (1H, m, H-4a), 2.20 (1H, m, H-14), 2.22 (1H, m, H-4b), 2.38 (2H, m, H<sub>2</sub>-7), 3.61 (1H, m, H-3), 3.72 (1H, m, H-6).  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  11.208 (C-18), 18.725 (C-21), 18.958 (C-19), 22.527 (C-26), 22.717 (C-11), 22.790 (C-27), 23.838 (C-15), 23.897 (C-23), 27.990 (C-25), 28.704 (C-16), 30.991 (C-2), 31.982 (C-4), 35.478 (C-1), 36.105 (C-22), 36.221 (C-20), 36.731 (C-12), 37.707 (C-10), 37.794 (C-7), 39.484 (C-24), 42.048 (C-13), 47.628 (C-5), 51.488 (C-14), 54.824 (C-17), 67.600 (C-6), 71.213 (C-3), 126.512 (C-8), 135.049 (C-9). IEEM  $m/z$  402 (100), 387 (42), 289 (14), 271 (21), 253 (10), 247 (83), 229 (22), 211 (13).

La comparación de sus datos físicos y espectroscópicos permitió identificar a este compuesto como peniocerol (**12**) (Djerassi *et al.*, 1965; Eggert y Djerassi, 1981; Kircher y Bird, 1982) compuesto previamente aislado de *Peniocereus fosterianus*, *P. macdougalli*, *P. greggii*, y de *Stenocereus thurberi* (Djerassi *et al.*, 1961.; Djerassi *et al.*, 1963; Knight *et al.*, 1966 Knight y Petit, 1969). Ver anexo 2.

Macdougallina (**13**): La cristalización lenta de las aguas madres del peniocerol se aislaron 1.22 g de un sólido blanco amorfo con un p.f. 121-124 ° C. IR  $\nu_{\max}$  3375, 2951, 2869, 1465, 1376, 1129, 1048  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN  $\delta$  0.69 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, d,  $J=6.5$  Hz,

H-26), 0.88 (3H, d,  $J=6.5$  Hz, H-27), 0.912 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 0.97 (3H, s, H-19), 0.99 (2H, m, H<sub>2</sub>-23), 1.21 (1H, m, H-4a), 1.22 (2H, m, H<sub>2</sub>-22), 1.26 (1H, m, H-7b), 1.30 (2H, m, H<sub>2</sub>-16), 1.32 (1H, m, H-5), 1.33 (1H, m, H-22), 1.4 (2H, m, H<sub>2</sub>-12), 1.46 (1H, m, H-2a), 1.66 (1H, m, H-15a), 1.68 (2H, m, H<sub>2</sub>-1), 1.69 (1H, m, H-25), 1.70 (1H, m, H-15b), 1.80 (3H, s, H-28), 1.81 (1H, m, H-2b), 2.03 (2H, m, H<sub>2</sub>-11), 2.09 (1H, m, H-17), 2.16 (1H, m, H-4a), 2.22 (1H, m, H-4b), 2.39 (2H, m, H<sub>2</sub>-24), 3.61 (1H, m, H-3), 3.8 (1H, m, H-6). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  15.703 (C-18), 18.325 (C-21), 18.735 (C-19), 21.767 (C-11), 22.528 (C-26), 22.807 (C-27), 24.096 (C-23), 24.345 (C-28), 27.992 (C-25), 28.138 (C-16), 30.775 (C-15), 30.892 (C-2), 31.024 (C-7), 32.034 (C-4), 35.374 (C-1), 36.033 (C-22), 36.443 (C-12 y C-20, no distinguibles), 37.732 (C-10), 39.504 (C-24), 44.528 (C-13), 47.736 (C-5), 49.610 (C-14), 50.431 (C-17), 67.641 (C-6), 71.171 (C-3), 133.097 (C-8), 133.625 (C-9). IEEM  $m/z$  416, 401, 387, 365, 261. La comparación de sus datos espectrales con aquellos informados en la literatura permitió identificar este compuesto como *macdougallina* (**13**), previamente aislado de *Peniocereus macdougallii* y *Stenocereus thurberi* (Knight *et al.*, 1966; Knight y Petit, 1969; Kircher y Bird, 1982). Hasta donde se sabe, ésta es la primera vez que se informa la asignación completa de las señales en <sup>1</sup>H RMN. Ver anexo 2.

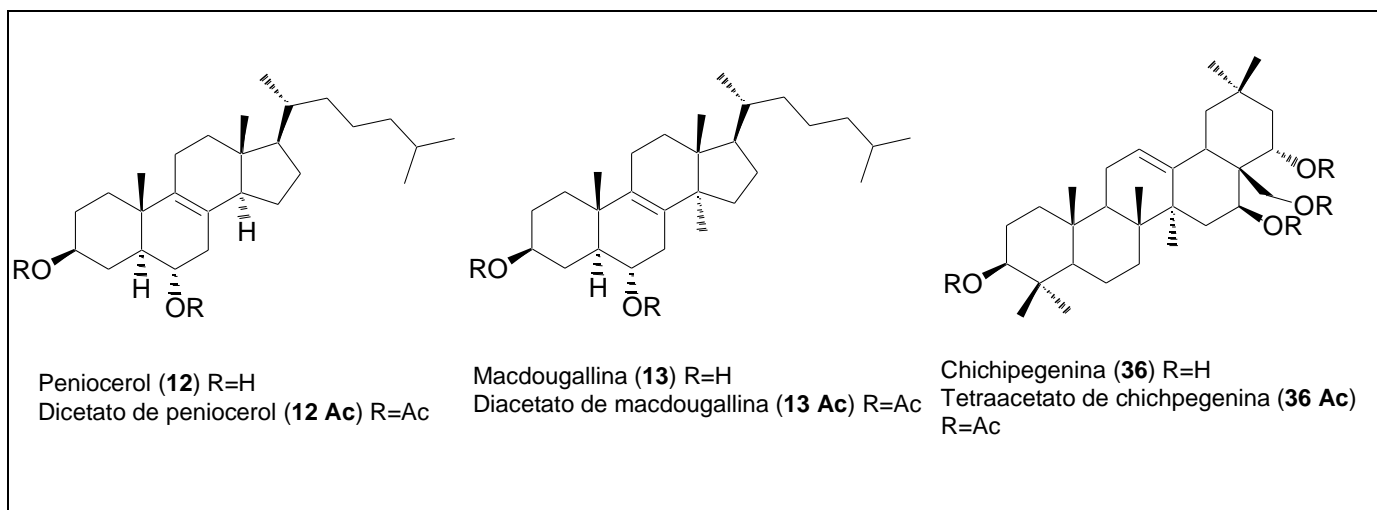
Ácido oleanólico (**26**). De las fracciones previas de donde se obtuvo **36** a partir del extracto metanólico crudo de partes aéreas (MetPA; 15 g), se obtuvieron 117 mg de un precipitado de color blanco con punto de fusión mayor a 300 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3437, 2943, 2861, 1695, 1031, 998 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  0.70 (1H, m, H-5), 0.75 (3H, s, H-26), 0.77 (3H, s, H-24), 0.90 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-25), 0.93 (3H, s, H-30), 0.98

(1H, m, H-1a), 0.99 (3H, s, H-23), 1.08 (1H, m, H-15a), 1.13 (3H, s, H-27), 1.16 (1H, dd,  $J=4.5, 2.0$  Hz, H-19a), 1.22 (1H, m, H-7a), 1.28 (1H, m, H-21a), 1.35 (1H, m, H-7b), 1.38 (1H, m, H-6a), 1.40 (1H, m, H-21b), 1.54 (1H, m, H-9), 1.55 (1H, m, H-6b), 1.57 (1H, m, H-22a), 1.60 (1H, m, H-19b), 1.61 (2H, m, H<sub>2</sub>-2), 1.62 (1H, m, H-16a), 1.62 (1H, m, H-1b), 1.71 (1H, td,  $J=14.0, 4$  Hz, H-15b), 1.76 (1H, td,  $J=14.0, 4.5$  Hz, H-22b), 1.88 (2H, m, H<sub>2</sub>-11), 1.98 (1H, td,  $J=13.5, 4.0$  Hz, H-16b), 2.82 (1H, dd,  $J=13.5, 4.5$  Hz, H-18), 3.20 (1H, dd,  $J=11.5, 4.5$  Hz, H-3), 5.3 (1H, t-like, H-12). <sup>13</sup>C-NMR (MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  15.320 (C-25), 15.540 (C-24), 17.151 (C-26), 18.308 (C-6), 22.937 (C-16), 23.405 (C-11), 23.581 (C-30), 25.939 (C-27), 27.199 (C-2), 27.697 (C-15), 28.107 (C-23), 30.685 (C-20), 32.457 (C-22), 32.633 (C-21), 33.058 (C-29), 33.820 (C-7), 37.101 (C-10), 38.419 (C-1), 38.770 (C-4), 40.997 (C-18), 41.612 (C-14), 45.889 (C-19), 46.548 (C-17), 47.647 (C-9), 55.249 (C-5), 79.036 (C-3), 122.656 (C-12), 143.587 (C-13), 183.266 (C-28). IEEM  $m/z$  456 (3) [M]<sup>+</sup>, 248 (64), 207 (15), 203 (35), 133 (14), 95 (27), 83 (36), 69 (60), 57 (84), 43 (100). La comparación de sus datos espectroscópicos y físicos permitió la identificación de éste compuesto como el ácido oleanólico (**26**) (Seebacher *et al.*, 2003). Ver anexo 2.

Debido a que las propiedades antiinflamatorias y de inhibición de proliferación celular de **26** han sido extensamente estudiadas (Ovesná, 2004; Liu, 2005; Sun *et al.*, 2006; Sultana, 2008; Laszczyk, 2009; Petronelli *et al.*, 2009; Gautam y Jachak, 2009; Sogno *et al.*, 2009; Ríos, 2010), en este trabajo se decidió no evaluar biológicamente éste compuesto.

## VII.6. Reacción de acetilación de peniocerol (12), macdougallina (13) y chichipegenina (36)

200 mg de cada compuesto se disolvieron por separado en piridina y se añadió un exceso de anhídrido acético a temperatura ambiente por 24 horas y agitación constante. Al término del tiempo, se extrajo el producto de la mezcla de reacción adicionando hielo, ácido clorhídrico y acetato de etilo. La fracción de acetato de etilo se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida en un rotavapor. Cada producto crudo se sometió a cromatografía en columna “flash” o se cristalizó directamente de metanol. Las identidades de los derivados; acetato de peniocerol (**12Ac**), acetato de macdougallina (**13Ac**) y acetato de chichipegenina (**36Ac**) se determinaron por sus datos espectroscópicos.



**Figura 14.** Estructuras químicas de los metabolitos aislados de *M. geometrizans* y sus derivados acetilados.

## **VII.7. Modelos de inflamación in vivo**

### **VII.7.1. Animales de laboratorio**

Los ratones de la cepa CD-1 y las ratas de la cepa Wistar utilizados en los diferentes ensayos se obtuvieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, y en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Se manipularon de acuerdo con las condiciones establecidas en la NOM-062-ZOO-1999. Se colocaron en cajas de polipropileno traslúcidas de paredes continuas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y humedad de 50-60 %, con acceso *ad libitum* de agua y dieta estándar de laboratorio.

### **VII.7.2. Inflamación inducida por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en oreja de ratón**

Para determinar la actividad anti-inflamatoria de los extractos orgánicos, fracciones y compuestos aislados de *M. geometrizans* se utilizó el modelo de inflamación en la oreja de ratón inducida por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA, Sigma).

Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito previamente (De Young *et al.*, 1989) con algunas modificaciones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). Así, se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 con pesos entre 25-30 g. Los animales se dividieron al azar en grupos (uno

por cada tratamiento) de por lo menos seis animales, los cuales se pesaron, marcaron y anestesiaron por vía *i.p.* con pentobarbital sódico (Sedalforte®) a una dosis de 31.5 mg/kg.

Una vez anestesiados los ratones, se aplicó por vía tópica 2.5 µg de TPA, disueltos en 10 µL de etanol, en ambos lados de la oreja derecha (5 µL por lado). La oreja izquierda sólo recibió el vehículo correspondiente (5 µL a cada lado). Después de 10 minutos, se aplicaron los extractos y las sustancias de prueba en sus respectivos vehículos y en las dosis indicadas en la Tabla 2, sobre ambos lados de la oreja derecha. Se aplicó indometacina disuelta en una mezcla de etanol y acetona (1:1 v/v) en un intervalo de dosis de 0.046 – 0.465 mg / oreja en la oreja derecha del grupo control como fármaco de referencia. El grupo control recibió en la oreja derecha la mezcla de disolventes correspondiente y en la misma cantidad que los tratados. La oreja izquierda de cada animal sirvió como control negativo. Después de 4 h, los animales fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> y se retiró una biopsia de 7 mm de diámetro de ambas oreja de cada animal.

La inflamación se evaluó como la diferencia de pesos (en mg) entre la biopsia de la oreja derecha, respecto a la biopsia de la oreja izquierda de cada animal. Los porcentajes de inhibición del edema (*EI%*) se calculó mediante la ecuación (1), donde A corresponde al valor promedio del edema en el grupo control, y B al valor promedio del edema del grupo tratado con las sustancias de prueba o el fármaco de referencia.

$$IE \% = 100 - \left( \frac{B}{A} \times 100 \right) \quad (1)$$

Para cada compuesto y sus derivados evaluados, se construyó una curva dosis-respuesta con los datos estadísticamente significativos. La dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub> en  $\mu\text{mol/oreja}$ ) se determinó a partir de las curvas anteriores que mostraron un efecto dependiente de la dosis, a las cuales se les realizó un ajuste lineal.

**Tabla 2.** Sustancias evaluadas en el modelo de inflamación inducida por TPA.

Sustancia	Dosis ( <sup>1</sup> mg/oreja ó <sup>2</sup> $\mu\text{mol/oreja}$ )	Vehículo
HexPA	<sup>1</sup> 1	A
HexR	<sup>1</sup> 1	A
DicR	<sup>1</sup> 1	B
MetR	<sup>1</sup> 1	B
MetPA	<sup>1</sup> 1	B
HMetPA	<sup>1</sup> 1	B
FEDicR	<sup>1</sup> 0.31	C
Peniocerol ( <b>12</b> )	<sup>2</sup> 0.031, 0.1, 0.31, 1	D
Macdougallina ( <b>13</b> )	<sup>2</sup> 0.1, 0.18, 0.31, 1	D
Chichipegénina ( <b>36</b> )	<sup>2</sup> 0.031, 0.1, 0.31, 1	D
<b>12Ac</b>	<sup>2</sup> 0.1, 0.31, 0.56, 1	D
<b>13Ac</b>	<sup>2</sup> 0.031, 0.1, 0.18, 0.31	D
<b>36Ac</b>	<sup>2</sup> 0.031, 0.1, 0.31, 1	D
Indometacina	0.046, 0.085, 0.150, 0.268, 1.3	C

A= Hexano; B= EtOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 v/v); C= EtOH-acetona (1:1 v/v); D= MeOH- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 v/v).



### **VII.7.3. Inflamación inducida por etilfenil-propiolato (EPP) en oreja de ratón**

La actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios aislados fue evaluada en el modelo de inflamación inducida en la oreja de ratón por etilfenil-propiolato (EPP por sus siglas en inglés) siguiendo el procedimiento anteriormente publicado (Recio *et al.*, 1995a) con algunas modificaciones. Los compuestos a evaluar (**12**, **13**, **36**, **12Ac**, **13Ac**, **36Ac**), se administraron por vía tópica a la concentración final de 0.5  $\mu\text{mol}$ /oreja disueltos en MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 v/v), 20  $\mu\text{L}$  en la oreja derecha de cada uno de los ratones (10  $\mu\text{L}$  en cada cara). La dexametasona se utilizó como fármaco de referencia a una dosis de 0.31  $\mu\text{mol}$ /oreja disuelta en etanol. Después de cuatro horas, una solución de EPP (5% p/v) en acetona (20  $\mu\text{L}$ ) se administró en el oído derecho. La oreja izquierda de cada animal recibió primero el vehículo (20  $\mu\text{L}$ ), y luego acetona (20  $\mu\text{L}$ ). Después de dos horas, los ratones fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub>. Una biopsia de 7 mm de diámetro fue retirada de cada oreja. La inflamación fue evaluada como la diferencia de peso entre las biopsias de las orejas derecha e izquierda de cada animal. La inhibición del edema (*IE%*), se calculó como fue descrito para TPA.

#### VII.7.4. Inflamación inducida por carragenina en pata de rata

El modelo del edema en la pata de rata inducido por carragenina se realizó de acuerdo con el método descrito anteriormente (Winter *et al.*, 1962) con algunas modificaciones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso entre 150-200 g, distribuidas al azar en grupos de seis o más animales por tratamiento. El volumen basal ( $V_0$ , mL) de la pata trasera derecha de cada rata se midió por triplicado en un pletismómetro previamente calibrado (modelo 7150, UGO Basile, Italia). Inmediatamente después, los compuestos de prueba (**12**, **13**, **36**) se administraron por vía *i.p.* disueltos en una mezcla de Tween 80 (5%) en agua y DMSO (9:1 v/v), a dosis de 45, 60, 100 mg/kg de peso corporal. El grupo control recibió el vehículo correspondiente. Se administró indometacina como fármaco de referencia por vía *i.p.* a dosis de 2.5, 5, 7.5 y 10 mg/kg en la misma mezcla de disolventes. El grupo control recibió por vía *i.p.* sólo la mezcla de disolventes.

Una hora después ( $t_0$ ), el edema en la pata derecha fue inducido mediante la administración subcutánea de 0,1 mL de carragenina tipo IV (Sigma) al 0.1% (p/v) en solución salina fisiológica en la región subplantar de la pata trasera. El volumen de la pata se midió 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la administración de la carragenina. La diferencia de los volúmenes a cada tiempo respecto a  $V_0$  representó una medida del edema. Con estos datos se construyó para cada tratamiento una curva temporal del edema, que representa el desarrollo del efecto farmacológico observado. A partir de dichas curvas se calculó de cada

una de ellas el área bajo la curva (ABC). Los valores de ABC permitieron determinar los porcentajes de inhibición del edema total (IE%) utilizando la ecuación (2), en donde A correspondió al valor promedio del ABC del grupo control, y B al valor de ABC para cada uno de los grupos tratados. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media.

$$IE\% = \left( \frac{A-B}{A} \right) \times 100 \quad (2)$$

Con los datos estadísticamente significativos se construyeron curvas dosis-respuesta para cada tratamiento, y se realizó un ajuste lineal, lo que permitió calcular los valores de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) para cada tratamiento.

#### **VII.7.5. Modelo de Hiperalgia inducida por carragenina**

Se utilizó el modelo de hiperalgia térmica inducida con carragenina previamente descrito (Hargreaves *et al.*, 1988; Dirig *et al.*, 1997). Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, las cuales recibieron una inyección subcutánea de 50  $\mu$ L de una suspensión de carragenina al 1% en solución salina, en la región plantar de la pata trasera derecha. Este momento constituye el tiempo cero (T<sub>0</sub>).

El curso temporal de la hiperalgia provocada con un estímulo térmico se evaluó colocando al animal dentro de un cubículo en la parte superior de un estimulador térmico

(Department of anesthesiology, University of California, San Diego, La Jolla, CA, EUA) el cuál consta de una caja con superficie de vidrio la cual se mantiene a una temperatura constante de  $30 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  mediante un sistema interno de calentamiento de aire.

El estímulo nociceptivo térmico ( $45^{\circ}\text{C}$ ) se originó con una lámpara eléctrica de 50 watts (8 V) montada en un brazo móvil, colocado inmediatamente debajo de la superficie de vidrio, el cual se manipula para que el haz de luz incida directamente en la pata de la rata. El estímulo térmico de 5.5 amperios produce una temperatura inicial de  $30^{\circ}\text{C}$ , incrementándose de forma rápida y gradual hasta alcanzar los  $45^{\circ}\text{C}$  a los doce segundos aproximadamente.

Al momento de iniciar cada estímulo térmico se activó automáticamente un cronómetro y para registrar el tiempo de latencia de la respuesta hiperalgésica hasta que la rata mueve la pata. El retiro de la pata se detectó por un sensor de arreglo de fotodiodos montado en el brazo móvil, que de forma automática detiene el cronómetro para registrar el tiempo y apaga el estímulo térmico.

La respuesta hiperalgésica se define como el tiempo requerido para el retiro abrupto de la pata de la rata, debido al estímulo térmico. En todos los casos, se midió un tiempo de corte del estímulo térmico de 20 segundos máximo para evitar daño tisular en la pata. Se evaluó la actividad anti-hiperalgésica de **12** administrado por vía *i.p.* disuelto en una mezcla de Tween 80 (5%) en agua y DMSO (9:1 v/v), a dosis de 8, 15, 30 y 60 mg/Kg de peso corporal. Como sustancia de referencia se utilizó ketorolaco a dosis de 10 mg/Kg de peso

corporal. Con los datos obtenidos se midió el curso temporal de la latencia de respuesta (seg) de la pata. Adicionalmente se calculó el área bajo la curva (ABC) para cada rata. Con estos datos se cuantificó el porcentaje de máximo efecto posible (MEP) alcanzado para cada dosis de peniocerol administrada, utilizando para ello la ecuación (3), en donde  $ABC_{\text{trat}}$  es el área bajo la curva del grupo que recibió peniocerol y carragenina;  $ABC_{\text{control}}$  es el área bajo la curva del grupo que recibió solo carragenina; y  $ABC_{\text{cutoff}}$  es el área bajo la curva total, calculada al tiempo de corte de 20 seg.

$$\%MEP = \frac{ABC_{\text{trat}} - ABC_{\text{control}}}{ABC_{\text{cutoff}} - ABC_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

Los datos se sometieron a un ajuste no lineal y se calculó la dosis efectiva media ( $DE_{50}$ ).

## **VII.8. Modelos “in vitro”**

### **VII.8.1. Producción del óxido nítrico en macrófagos de ratón**

#### **VII.8.1.1. Obtención de macrófagos peritoneales de ratón**

Se siguió el método previamente descrito, para el cultivo y aislamiento de células primarias de los macrófagos peritoneales (Oviedo-Chávez, *et al.*, 2004). Un grupo (n = 3) de ratones hembras CD-1 con un rango de peso de 25-30 g, fueron inyectados *i.p.* con 1 mL de medio de tioglicolato Brewer (BD Dioxon, Becton Dickinson de México) al 3 % (p/v), 3 días antes de la cosecha. Después de ese tiempo, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub>. Se administró en las paredes peritoneales 10 mL de medio de cultivo modificado Dulbecco's (DMEM; GIBCO, Gran Isla, NY, EU) suplementado con penicilina (50 µg/mL), estreptomycin (50 UI/mL) y suero bovino fetal (SBF, GIBCO) al 5 %. Se aplicó un masaje abdominal intenso y se obtuvo el líquido peritoneal, que contiene a las células de exudado peritoneal. El líquido obtenido se centrifugó durante 6 min (3400 rpm, 20 °C). El botón celular se suspendió en DMEM, y las células se sembraron en placas de 24 pozos (Becton Dickinson, Osnard, California, EU) a una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> al 5%. Al término del tiempo, las células no adherentes se lavaron y se adicionó DMEM fresco suplementado con SBF al 10%. Las células fijadas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, con o sin 50 µL de lipopolisacárido 10 µg/mL (LPS, de *E. coli* serotipo 055:B5, Sigma) y en la ausencia o presencia de compuestos de la prueba (**12**, **13**, **36**) disueltos en EtOH en concentraciones de

0.001 a 10 mM. La concentración final de EtOH en el sobrenadante de cultivo celular fue de 0.1%, y esta concentración no mostró ningún efecto en los ensayos.

### VII.8.1.2. Evaluación de nitritos

La producción de óxido nítrico se determinó indirectamente mediante la cuantificación de nitritos acumulados en el medio de cultivo celular a través de la reacción de Griess (Dirsch *et al.*, 1998). Se preparó el reactivo de Griess constituido por una mezcla en relación 1:1, de una disolución de sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) al 5 % y otra disolución de dihidroclorhidrato de N-(1-naftil) - etilendiamina al 0.1% en agua desionizada. Para llevar a cabo la reacción, se colocaron en una placa de 96 pozos 100 µL del reactivo anterior, y 100 µL de los sobrenadantes de los cultivos celulares, a 20 ° C durante 10 min y sin agitación. A continuación la densidad óptica (DO) de cada muestra se leyó en un lector de microplacas (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.) a 515 nm. La concentración de nitritos (µM) se conoció por interpolación de los resultados de DO en una curva estándar construida con concentraciones conocidas de NaNO<sub>2</sub> desde 0.01 hasta 50 µM. Las densidades ópticas se relacionaron directamente con la concentración de NO. La inhibición de la cantidad de NO (% I) se calculó de acuerdo con la ecuación (4), en donde A corresponde al valor promedio de concentración de NO en el grupo control, y B es la cantidad de NO producida por cada grupo de ensayo.

$$\%I = 100 - \left( \frac{B}{A} \times 100 \right) \quad (4)$$

### VII.8.1.3. Citotoxicidad por MTT

La respiración de las células, un indicador de la viabilidad celular, se determinó en el resto de los macrófagos mediante el método colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma) descrito previamente (Mosmann, *et al.*, 1983). 10  $\mu$ L de MTT a una concentración final de 5 mg/ml disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS, Sigma) se añadieron a cada pozo que contenía las células restantes del ensayo anterior. Las células se incubaron durante 4 horas a 37 ° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Los cristales de formazán recién formados en las mitocondrias de las células viables se disolvieron con DMSO (100  $\mu$ L) en agitación constante durante 10 min. Al término se midieron las absorbencias en un lector de microplacas a 515 nm. Los resultados se calcularon considerando las absorbencias de las células tratadas con respecto al control.

### VII.8.2. Evaluación de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO)

La evaluación de la actividad de **12** sobre de la enzima mieloperoxidasa (MPO) se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos por Bradley *et al.* (1982) y Suzuki *et al.* (1983). De forma breve, se indujo la inflamación de forma idéntica como se describió en el apartado VI.6.1. Se administraron por vía tópica tanto el TPA, como **12** (0.09  $\mu$ mol/oreja) e indometacina (0.272  $\mu$ mol/oreja) en dos grupos de cuatro ratones macho de la cepa CD-1, cada uno. Los ratones de un grupo se sacrificaron a las tres horas posteriores a la aplicación del TPA y se obtuvieron biopsias de 7 mm de ambas orejas de cada ratón,



mientras que los ratones del segundo grupo se sacrificaron a las seis horas y se obtuvieron biopsias de ambas orejas en idénticas condiciones (Murakawa *et al.*, 2006). Las muestras de las orejas provenientes de ambos grupos se pesaron y congelaron con hielo seco en un tubo eppendorf seco. Las muestras se homogeneizaron mecánicamente en seco y se añadieron 1 mL de HTAB al 0.5 % frío para continuar con la homogenización por 60 s. El homogenizado se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C durante 10 min. Al término, se pasaron 10 µL de sobrenadante a una microplaca de 96 pozos y se añadieron 180 µL de PBS 80 mM, pH= 5.4. La placa se calentó a 37 °C y se mantuvo a esta temperatura durante el resto del ensayo. Se añadieron 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.017 %. La reacción se inició al adicionar 20 µL de clorhidrato de tetrametilbencidina (TMB) 18.4 mM en una disolución acuosa de dimetilformamida (DMF) al 50 %. Se incubó a 37 °C durante 5 min con agitación constante. La reacción se detuvo adicionando 20 µL de ácido sulfúrico 2.0 M en un baño de hielo. La actividad enzimática se determinó colorimétricamente empleando un lector de placas, midiendo la absorbencia a 450 nm. El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática (IA%) se calculo con la ecuación (5), en donde Ac es la absorbencia del grupo control y Ap es la absorbencia del grupo problema.

$$IA \% = \left( \frac{Ac - Ap}{Ac} \right) \times 100 \quad (5)$$

### **VII.8.3. Proliferación de líneas celulares de cáncer humano**

#### **VII.8.3.1. Cultivos celulares**

Las líneas celulares de carcinoma de próstata humano (PC-3), leucemia (K-562), carcinoma del sistema nervioso central (U251), carcinoma de mama (MCF-7), y el carcinoma de colon (HCT-15) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina G, 100 mg/mL de sulfato de estreptomicina, y 1% de aminoácidos no esenciales. Estos cultivos se mantuvieron a 37 ° C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, con un 95% de humedad. Las células adherentes se separaron con 0,1% de tripsina - EDTA para hacer suspensiones unicelulares. Las células viables fueron contadas con un hematocitómetro. Las células (5.000 - 10.000 células/pozo) fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos y se incubaron por 24 h en las mismas condiciones mencionadas en este mismo párrafo.

#### **VII.8.3.2. Evaluación de la proliferación celular con SRB**

Los efectos de inhibición de la proliferación celular de los compuestos (**12**, **13**, **36**, **12Ac**, **13Ac**, **36Ac**) se realizaron siguiendo los protocolos descritos anteriormente (Monks *et al.*, 1991) con algunas modificaciones (Salazar *et al.*, 2011). Después de 24 h, las células cultivadas en las placas fueron tratadas con siete diferentes concentraciones (1-50 mM) de los compuestos de prueba disueltos en DMSO (20 mM) junto con el medio para producir

las concentraciones deseadas. Las placas se incubaron durante otras 48 horas en las mismas condiciones. La doxorubicina se utilizó como control positivo a cinco concentraciones diferentes (0.01-5  $\mu\text{M}$ ). Después de este tiempo, los cultivos de células adherentes se fijaron *in situ* mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$ /pozo de ácido tricloroacético frío al 50 % (p/v), dejando reposar por 60 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes se desecharon, y los pozos se lavaron tres veces con agua destilada desionizada y se permitió secar a temperatura ambiente. Al término del tiempo, las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 100  $\mu\text{L}$  de sulforrodamina B (SRB, Sigma) al 0.4 %. Posteriormente, la disolución de SRB sin consolidar se eliminó luego de lavar los pozos tres veces con ácido acético al 1%. Las placas se secaron al aire, y la SRB unida a proteínas se extrajo con una disolución 10 mM de base Tris (Sigma) no amortiguada. Se leyeron las densidades ópticas (DO) en un lector de placas de espectrofotometría automatizada en una longitud de onda de 515 nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas. La citotoxicidad como porcentaje de inhibición de la proliferación celular (*IC %*) se calculó conforme la ecuación (6), en donde A corresponde al valor de DO de las células sin tratar, mientras que B, al valor de DO de las células tratadas con las sustancias de prueba.

$$IC \% = 100 - \left( \frac{B}{A} \times 100 \right) \quad (6)$$

Las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento celular en un 50% (*IC*<sub>50</sub>) fueron calculadas a partir de curvas de dosis – respuesta con puntos significativos, mediante la interpolación de dichas curvas.

## ***VII.9. Análisis estadístico***

Los resultados se expresan como la media de los valores  $\pm$  SEM (error estándar de las medias,  $SD/\sqrt{n}$ ). La desviación típica y el error tipo de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, se determinó usando el ensayo de varianza ANOVA seguido de la prueba de Dunnett, para comparaciones múltiples. Los valores de  $P < 0,05$  (\*) se consideran significativos y los valores  $P < 0,01$  (\*\*) se consideran muy significativos.

## VIII. Resultados y discusión

La especie *Myrtillocactus geometrizans* es un importante recurso biótico en los diferentes ecosistemas donde se localiza, siendo una de las especies dominantes del paisaje. A pesar de ser abundante, su lento crecimiento, el uso frecuente como fuente de obtención de alimento, su tala para aprovechamiento del terreno con fines agrícolas y ganaderos, o simplemente la indiferencia hacen que la especie esté sometida a una fuerte presión. Por otro lado, en la literatura existen varios informes que describen los usos que las diferentes comunidades le dan, sobresaliendo dos en los que se menciona su uso en forma de emplastos útiles para el tratamiento de lesiones por golpes, fracturas o inflamaciones, sin embargo no existen en la literatura estudios que exploren su farmacología ni que validen su uso (Luna-Morales y Aguirre, 2001; Sánchez-González *et al.*, 2008).

En nuestro grupo hemos estado interesados en la búsqueda sistemática de metabolitos secundarios de plantas medicinales que posean actividad antiinflamatoria y al mismo tiempo que inhiban la proliferación de células de cáncer humano. Debido a lo anterior, se decidió estudiar la química y la actividad antiinflamatoria e inhibitoria de la proliferación celular de los metabolitos secundarios obtenidos tanto de partes aéreas como de raíces de *M. geometrizans* como a continuación se describe.

### ***VIII.1. Actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos***

Los ésteres de forbol, incluyendo el 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA por sus siglas del inglés), son diterpenos aislados de especies de la familia Euphorbiaceae, que tienen acción inflamatoria y pro carcinogénica (Hecker, 1968). La aplicación tópica en la oreja del ratón, de TPA induce una respuesta inflamatoria prolongada, intensa y bifásica, en la epidermis. La primera fase está caracterizada por el edema de la dermis y el aumento de los niveles de TNF- $\alpha$ . La segunda fase se caracteriza por inducir la enzima COX-2 acompañada por la acumulación de células proinflamatorias, y la producción de eicosanoides, tales como el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) y la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Así mismo se observa un aumento de la actividad de la mieloperoxidasa e inducción de la iNOS, entre otros eventos (Sánchez y Moreno, 1999a; Murakawa *et al.*, 2006).

Esta respuesta biológica del TPA es multifactorial y se sabe que su efecto pro inflamatorio y pro carcinogénico se debe entre otros factores, a su estereoquímica que le permite ser un análogo conformacional del diacilglicerol y en consecuencia desencadena varios eventos bioquímicos vinculados con la activación de la proteína cinasa C (PKC por sus siglas en inglés) dependiente de calcio (Castagna *et al.*, 1982). También se conoce que este diterpeno activa a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Holden *et al.*, 2008; Karin, 1997; Schlingemann *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que el TPA aumenta la concentración de eicosanoides por dos mecanismos principales: por un lado estimula la activación de PLA<sub>2</sub> (Nam *et al.*,

1990) incluyendo las isoformas sPLA<sub>2</sub>-IID, -IIF and -V (Hamaguchi *et al.*, 2003); mientras que por el otro induce la expresión de enzimas como la COX-2 (Sánchez y Moreno, 1999a) y la activación y traslocación de 5-LO (Werz *et al.*, 2001). De esta forma induce la liberación del ácido araquidónico, y la posterior síntesis de PGE<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub> (Nakamura *et al.*, 2003). En el mismo contexto, también se ha demostrado que el TPA induce quimiotaxis e infiltración de neutrófilos y monocitos, así como el aumento de la actividad de la mieloperoxidasa en los sitios de aplicación (Sánchez y Moreno, 1999b).

Con la finalidad de seleccionar aquellos extractos anti-inflamatorios más activos, los extractos de: hexano (HexR), diclorometano (DicR), y metanol (MetR) obtenidos de la raíz; los extractos de: hexano (HexPA) y de metanol (MetPA) de las partes aéreas; así como los extractos de hexano y de metanol de la mezcla de la reacción de hidrólisis de MetPA (HMetPA) se evaluaron en el modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por TPA. En la tabla 3 se muestran los resultados de la actividad antiinflamatoria.

**Tabla 3.** Efectos de los extractos obtenidos de *M. geometrizans* en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por TPA. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; n= 6 animales.

Tratamiento	Rendimiento (g)	Oreja control (mg)	Oreja tratada (mg)	Edema (mg)	Promedio $\pm$ error estándar	% de inhibición
Control	-	8.4	23	14.8	15.66 $\pm$ 0.87	-
		7.6	25	17		
		8	23	14.8		
HexR	9	8.9	15.6	6.7	10.20 $\pm$ 1.85 *	34.33
		8.2	21.2	13		
		8.9	19.8	10.9		
HexPA	17	8	10.7	2.7	5.36 $\pm$ 1.45 *	65.45
		8	13.7	5.7		
		8.6	16.3	7.7		
Control	-	9.8	26	16	17.96 $\pm$ 1.21	-
		8.9	29	20.2		
		9	27	17.7		
DicR	19	9.2	19.7	10.5	9.66 $\pm$ 0.78 **	46.20
		8.7	19.1	10.4		
		9.1	17.2	8.1		
MetR	93	8.7	18.3	9.6	7.90 $\pm$ 0.98 **	56.03
		9.2	15.4	6.2		
		8.9	16.8	7.9		
MetPA	62	9	17.8	8.8	8.40 $\pm$ 0.55 **	53.25
		8.5	17.6	9.1		
		8.9	16.2	7.3		
HMetPA	7	9.1	11.9	2.8	5.30 $\pm$ 1.30 **	70.5
		9	16.2	7.2		
		9.4	15.3	5.9		

La actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación inducida por TPA en oreja de ratón se utilizó como criterio de inclusión y aquellos extractos más activos y abundantes se seleccionaron para su estudio. De los extractos evaluados, el más activo fue el extracto de hexano de partes aéreas (HexPA) que inhibió el edema inducido por TPA un 65.45 %, seguido del extracto de metanol de raíces (MetR) que mostró una inhibición del 56.03 %, mientras que la inhibición del edema por MetPA fue de 53.25 %. La mezcla de reacción de hidrólisis de MetPA tuvo una inhibición del edema de 70.5 %.



Los extractos seleccionados, con base en su actividad y abundancia para su fraccionamiento con la finalidad de aislar compuestos activos, fueron la hidrólisis del extracto de metanol de partes aéreas (HMetPA) y de metanol de raíces (MetR). De dichos extractos se aislaron chichipegina (**36**), macdougallina (**13**) y peniocerol (**12**) como se ha descrito en la sección experimental de éste trabajo (ver Figura 14).

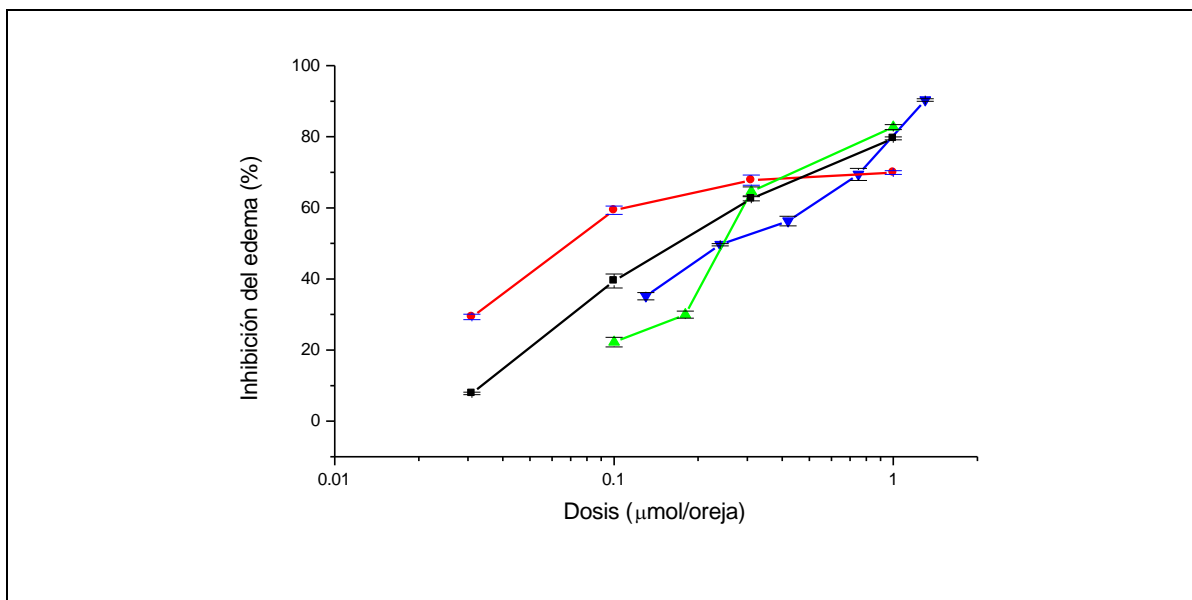
Los efectos anti-inflamatorios de **12**, **13** y **36**, además de sus derivados acetilados **12Ac**, **13Ac** y **36Ac** e indometacina como fármaco de referencia se evaluaron en este modelo. Los valores de DE<sub>50</sub> expresados en  $\mu\text{mol/oreja}$  se muestran a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Efecto de las sustancias aisladas de *M. geometrizans* sus derivados acetilados e indometacina en el modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por TPA. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; Edema promedio  $\pm$  EEM; n= 6-9 animales. Los datos de concentración efectiva 50 % ( $CE_{50}$ ) se obtuvieron de la regresión lineal de las curvas con datos significativos.

Muestra	Dosis ( $\mu$ mol/oreja)	Edema	% de inhibición	$CE_{50}$ ( $\mu$ mol/oreja)
<b>36</b>	0	12.55 $\pm$ 0.38	-	<b>0.172</b> <b>r = 0.99</b>
	0.031	11.57 $\pm$ 0.35	7.77	
	0.1	7.60 $\pm$ 1.96 **	39.44	
	0.31	4.70 $\pm$ 0.60 **	62.55	
	1	2.57 $\pm$ 0.41 **	79.48	
<b>12</b>	0	14.46 $\pm$ 0.70	-	<b>0.091</b> <b>r = 0.95</b>
	0.031	10.22 $\pm$ 0.79 *	28.20	
	0.1	5.88 $\pm$ 1.18 **	58.71	
	0.31	4.66 $\pm$ 1.44 **	67.23	
	1	4.35 $\pm$ 0.53 **	69.45	
<b>13</b>	0	15.21 $\pm$ 0.78	-	<b>0.27</b> <b>r = 0.97</b>
	0.1	11.83 $\pm$ 1.34	16.73	
	0.18	10.65 $\pm$ 1.00 **	35.71	
	0.31	5.38 $\pm$ 1.25 **	62.15	
	1	2.63 $\pm$ 0.71 **	81.5	
<b>36Ac</b>	0	15.97 $\pm$ 0.58	-	<b>0.35</b> <b>r = 0.99</b>
	0.031	13.75 $\pm$ 0.34	13.93	
	0.1	11.07 $\pm$ 0.84 *	30.67	
	0.31	8.75 $\pm$ 1.47 **	45.23	
	1	5.07 $\pm$ 1.37 **	68.23	
<b>12Ac</b>	0	12.71 $\pm$ 0.29	-	<b>0.59</b> <b>r = 0.99</b>
	0.1	13.72 $\pm$ 0.43	-7.93	
	0.31	9.07 $\pm$ 0.40 *	28.64	
	0.56	6.15 $\pm$ 1.92 **	51.64	
	1	4.57 $\pm$ 0.51 **	64.02	
<b>13Ac</b>	0	14.11 $\pm$ 0.94	-	<b>0.24</b> <b>r = 0.94</b>
	0.031	13.60 $\pm$ 1.31	3.64	
	0.1	10.52 $\pm$ 0.46 *	25.4	
	0.18	9.37 $\pm$ 0.26 **	33.58	
	0.31	5.47 $\pm$ 1.37 **	61.21	
Indometacina	0	16.24 $\pm$ 0.86	-	<b>0.272</b> <b>r = 0.97</b>
	0.13	10.53 $\pm$ 1.04 **	35.15	
	0.24	8.18 $\pm$ 0.34 **	48.18	
	0.42	7.10 $\pm$ 1.34 **	56.29	
	0.75	4.97 $\pm$ 1.70 **	69.42	
	1.3	1.57 $\pm$ 0.33 **	89.19	

Todos los metabolitos secundarios evaluados, mostraron un potente efecto anti-inflamatorio, mostrando un comportamiento dosis-dependiente, en un rango de concentraciones de 0.031 a 1  $\mu\text{mol/oreja}$ , al igual que la indometacina, utilizada como fármaco de referencia. La chichipegénina (**36**) mostró una dosis efectiva ( $DE_{50} = 0.172 \mu\text{mol/oreja}$ ) menor que indometacina ( $DE_{50} = 0.272 \mu\text{mol/oreja}$ ). Mientras que de los dos esteroides **12** y **13** evaluados, el más activo resultó ser **12**, cuya  $DE_{50}$  ( $0.09 \mu\text{mol/oreja}$ ) es un orden de magnitud menor a la mostrada por indometacina mientras que **13** mostró una  $DE_{50}$  ( $0.27 \mu\text{mol/oreja}$ ) de igual potencia que la mostrada por la indometacina.

En cuanto a la potencia de las sustancias evaluadas (ver Figura 15), peniocerol (**12**) es el compuesto más potente, seguido de chichipegénina (**36**), macdougallina (**13**) e indometacina. Debido a que peniocerol es más potente que macdougallina, la presencia de un grupo  $14\alpha$ -metil adicional en la última como única diferencia estructural entre ambas moléculas, parece importante para explicar la mayor potencia anti-inflamatoria en peniocerol.



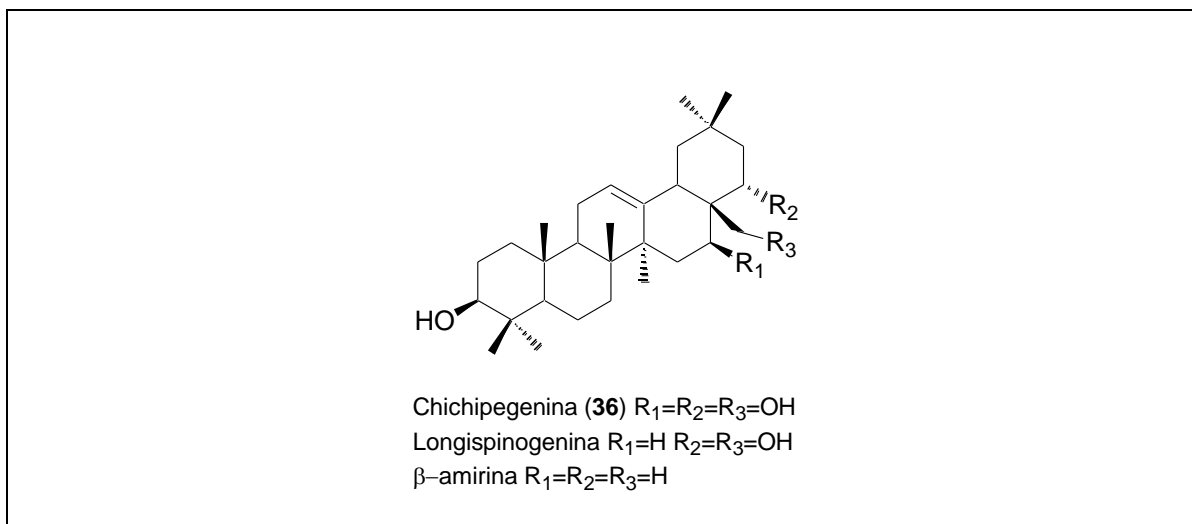
**Figura 15.** Comparación de la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de *M. geometrizans* chichipegenina **36** (■), peniocerol **12** (●), macdougallina **13** (▲), e indometacina (▼). Los datos representan el promedio  $\pm$  EEM; n= 6 animales.

Por otro lado, el derivado tetra acetilado de chichipegenina (**36Ac**), mostró una actividad menor ( $DE_{50} = 0.35 \mu\text{mol/oreja}$ ) que **36** y la indometacina. Mientras que el derivado diacetilado de peniocerol (**12Ac**) presentó una  $DE_{50}$  ( $0.59 \mu\text{mol/oreja}$ ) de un orden de magnitud mayor que **12**. En contraste, el derivado diacetilado de macdougallina (**13Ac**) presentó una  $DE_{50}$  ( $0.24 \mu\text{mol/oreja}$ ) de la misma magnitud que **13**.

Estos resultados sugieren que al menos para chichipegenina (**36**) y peniocerol (**12**) la polaridad de la molécula es importante para la actividad antiinflamatoria, ya que sus derivados acetilados menos polares fueron menos activos. Mientras que para la

macdougallina (**13**), los resultados muestran que la actividad antiinflamatoria no se ve modificada por efecto de los grupos acetato.

Debido a la presencia ubicua de los triterpenos, la actividad antiinflamatoria de una gran cantidad de ellos se ha estudiado extensamente en el modelo de edema inducido por TPA, de los cuales se han descubierto diferentes mecanismos de acción y distintas potencias antiinflamatorias (Huget *et al.*, 2000; Ukiya *et al.*, 2001; Hernández-Pérez *et al.*, 2004; Banno *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2007). Algunos triterpenos estructuralmente relacionados con chichipegénina (**36**), se han evaluado en este modelo, y al parecer existe una relación entre la actividad antiinflamatoria y el grado de oxidación de la molécula. Se ha propuesto que a mayor número de grupos hidroxilos presentes en el esqueleto de la  $\beta$ -amirina mayor será la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA. Esta propuesta es apoyada por los resultados obtenidos en el presente estudio. De esta forma, tomando en cuenta el número de hidroxilos y los valores de DE<sub>50</sub> (mg/oreja) informados en la literatura (Akihisa and Yasukawa, 2001; Yasukawa *et al.*, 1996) así como los obtenidos para la chichipegénina en el presente trabajo se obtiene la siguiente serie:  $\beta$ -amirina < longispinogénina < chichipegénina (ver Figura 16), el mismo orden en cuanto al número de hidroxilos presentes en las moléculas (1: 3: 4). Sin embargo para comprobar esta hipótesis se requieren experimentos adicionales, los cuales no están contemplados en los objetivos de este trabajo.



**Figura 16.** Estructura de chichipegina, longispinogenina y  $\beta$ -amirina, aislados de diferentes especies de cactáceas.

Por otro lado, la administración tópica de **12**, **13** y **36** inhibió el edema inducido por TPA en la misma magnitud, o más que indometacina, que es un inhibidor no selectivo de COX (Masferrer *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren que **12**, **13** y **36** podrían interferir con la biosíntesis de los eicosanoides, mediante la inhibición de la COX.

## **VIII.2. Edema inducido por EPP en oreja de ratón**

El fenilpropiolato de etilo (EPP por sus siglas en inglés) es una agente químico irritante, que produce en la oreja de ratón una reacción inflamatoria aguda así como pro-carcinogénica. Los efectos biológicos que produce esta sustancia cuando es aplicado tópicamente están relacionados con su capacidad de generar edema, en conjunto con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular a lo largo del tiempo (Patrick *et al.*, 1985). Esta sustancia se ha empleado como agente inflamatorio (Brattsand *et al.*, 1982) y se ha demostrado su utilidad como promotor moderado de tumores. Se conoce que induce una serie de cambios morfológicos en la piel tratada, similar al mostrado por ésteres de forbol, pero sin la interacción con la PKC como lo hacen los ésteres de forbol (Cameron *et al.*, 1991).

En diferentes ocasiones se ha mencionado que el mecanismo ejercido por EPP es distinto al de agentes inflamatorios de tipo forbol, y que este modelo es útil para distinguir si una sustancia tiene efecto anti-inflamatorio tipo AINEs o esteroidal, toda vez que indometacina y otros AINEs son incapaces de inhibir la actividad inflamatoria de EPP, y sólo es inhibido por agentes de tipo esteroidal como dexametasona (Recio *et al.*, 1995a; Recio *et al.*, 1995b; Giner-Larza *et al.*, 2001; Nieto-Mendoza *et al.*, 2005).

En este trabajo, se evaluaron las sustancias aisladas de *M. geometrizans* en el modelo de edema inducido por EPP. Los efectos de las sustancias aisladas de *M.*

*geometrizarans* en el modelo de edema inducido por EPP en oreja de ratón se muestran a continuación en la tabla 5.

**Tabla 5.** Efectos de las sustancias aisladas de *M. geometrizarans* y sus derivados acetilados en el modelo de inflamación en oreja de ratón inducida por EPP. Promedio  $\pm$  EEM; \*  $P < 0.01$ ; n= 4 animales; Dex= dexametasona.

Muestra	Oreja control mg	Oreja tratada mg	Edema mg	Promedio	% de inhibición
Control	9.6	14	4.4	3.4 $\pm$ 0.339	----
	9.8	13	3.2		
	9.9	13	3.1		
	10	12.9	2.9		
36	10.4	12.2	1.8	2.93 $\pm$ 0.668	13.97
	9.1	11	1.9		
	8.5	11.9	3.4		
	9.6	14.2	4.6		
12	11.6	13.9	2.3	3.15 $\pm$ 0.52	7.35
	9.4	11.9	2.5		
	9.7	14.3	4.6		
	9.2	12.4	3.2		
13	9.4	12.5	3.1	2.45 $\pm$ 0.444	27.94
	9.9	11.2	1.3		
	10.4	12.6	2.2		
	9.4	12.6	3.2		
36Ac	9.5	10.4	0.9	2.23 $\pm$ 0.709	34.56
	9.2	12.7	3.5		
	9.6	13	3.4		
	9.6	10.7	1.1		
12Ac	9.3	12.7	3.4	1.73 $\pm$ 0.596*	49.26
	8.7	10	1.3		
	9.1	10.7	1.6		
	9.5	10.1	0.6		
13Ac	9.7	10.9	1.2	1.55 $\pm$ 0.233*	54.41
	8.9	10.9	2		
	10.6	12.5	1.9		
	8.6	9.7	1.1		
Control	9.6	13	3.4	3.23 $\pm$ 0.312	----
	9.6	12	2.4		
	8.1	12	3.9		
	9.1	12.3	3.2		
Dex	9.8	10.8	1.2	1.20 $\pm$ 0.268*	62.79
	10.3	11.2	0.9		
	9.7	10.6	0.9		
	8.9	10.9	2		

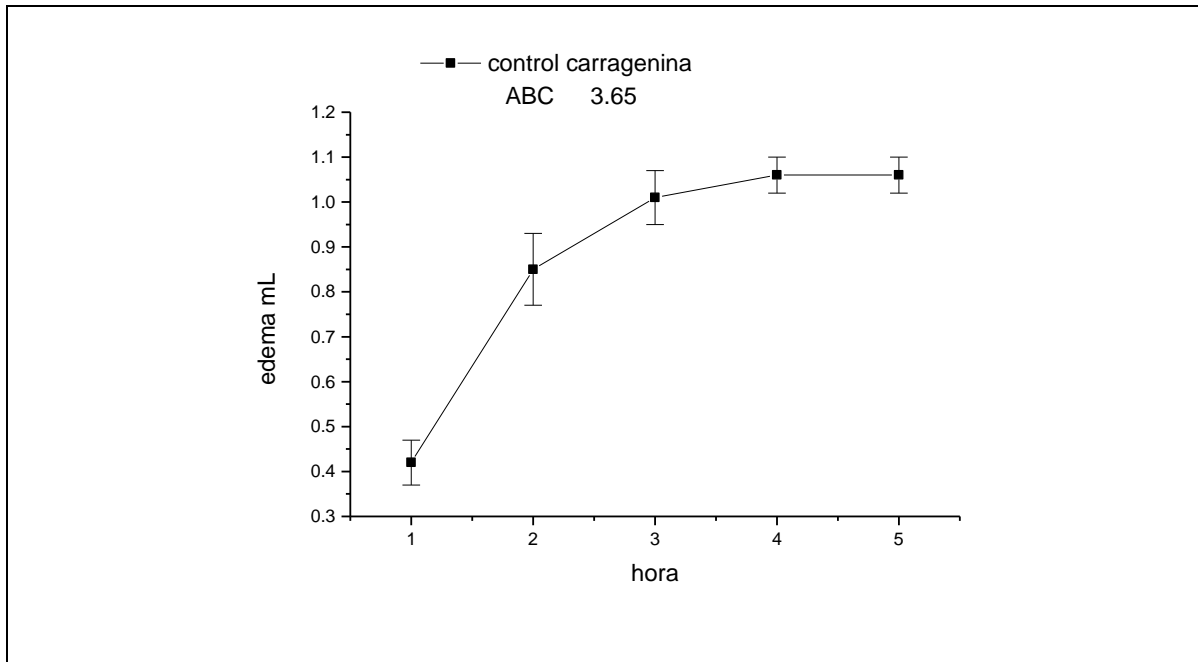


De los metabolitos secundarios aislados de *M. geometrizzans* evaluados en el modelo de edema inducido por EPP, **36** y **12** mostraron actividad muy pobre (13.97 y 7.35 % respectivamente), mientras que **13** mostró una actividad moderada (27.94 %), con respecto al control dexametasona (62.79 %). Cabe mencionar que en este modelo, los derivados acetilados de los metabolitos secundarios mostraron una mayor actividad, siendo los más activos los diacetatos de peniocerol (**12Ac**) y de macdougallina (**13Ac**), los cuales a la concentración evaluada de 0.5 µmol/oreja, inhibieron el edema inducido por EPP en un 54.41 y 49.26 % respectivamente. La dexametasona a una concentración de 0.31 µmol/oreja, inhibió el edema un 62.79 %, mostrando que aquellos fármacos de tipo esteroideal si tienen actividad en el modelo.

A pesar de que la literatura atribuye a este modelo la capacidad de discernir entre un fármaco de acción tipo esteroideal de un AINEs, existen informes de la actividad supresora del edema de fenilbutazona, un inhibidor de COX (Panthong *et al.*, 2004; Keardrit *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque no es posible determinar si el mecanismo es vía esteroideal, este modelo nos sugiere que la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de *M. geometrizzans* está más relacionada con los mecanismos inducidos por TPA como la activación de PKC y la expresión de COX-2 y consecuente producción de eicosanoides, que con otro tipo de acción.

### ***VIII.3. Edema inducido por carragenina en pata de rata***

El modelo de edema inducido por carragenina en pata de rata es un modelo clásico en la investigación de fármacos anti-inflamatorios inhibidores de COX. La inyección subcutánea de este agente irritante origina un edema agudo en la pata de rata, de un mecanismo celular y molecular complejo, que se desarrolla en dos fases distinguibles: una fase inicial (alrededor de las primeras tres horas) mediada por la liberación de aminas vasoactivas (como la histamina, serotonina y 5-hidroxitriptamina), la síntesis y liberación de óxido nítrico (ON) producido por la isoforma neuronal de la Óxido Nítrico Sintasa (*n*-NOS), y por último, la liberación de cininas, como ejemplo bradicinina; enseguida se desarrolla una fase final (las siguientes horas) atribuida a la producción local de especies reactivas de oxígeno, infiltración de neutrófilos y aumento en la expresión y actividad de COX-2, que propicia una elevada producción de prostaglandinas (PG), además de la liberación de ON, pero ahora sintetizado por la isoforma inducible de la Óxido Nítrico Sintasa (*i*-NOS) entre otros mediadores (Di Rosa, 1972; García-Leme *et al.*, 1973; Seibert *et al.*, 1994; Salvemini *et al.*, 1996; Handy y Moore, 1998; Nantel *et al.*, 1999; Morris, 2003).



**Figura 17.** Efectos de la administración de carragenina (■) a lo largo del tiempo en la región subplantar de la pata de rata. Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM;  $n=6$  animales; ABC= área bajo la curva, calculada a partir de la integración de la curva.

La aplicación subplantar de carragenina en la pata de la rata produjo un edema con un curso temporal, y un máximo a las 4 horas con una diferencia de  $1.06 \pm 0.04$  mL con respecto al volumen inicial de la pata medido al tiempo cero. El área bajo la curva del grupo control fue de  $3.65 \pm 0.1$ , la cual representa el curso temporal total del efecto de la carragenina en la pata de la rata (ver Figura 17).

Los efectos de las sustancias aisladas de *M. geometrizans* e indometacina en el modelo de edema inducido por carragenina en pata de rata se muestran a continuación en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Efectos de la administración *i.p.* las sustancias aisladas de *M. geometrizans* en el modelo de inflamación en pata de rata inducida por carragenina. Datos expresados como el promedio  $\pm$  EEM; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; n= 6-9 animales. Los valores de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) en mg/Kg se obtuvieron de la interpolación de las curvas de ABC vs dosis (mg/Kg) de cada sustancias, utilizando datos significativos.

Grupo	Dosis [mg/kg]	Edema [mL]					ABC	Inhibición de ABC (%)	DE <sub>50</sub> [mg/kg]
		Tiempo [h]							
		1	2	3	4	5			
Control	-	0.42 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.06	1.06 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.04	3.65 $\pm$ 0.1	-	-
<b>36</b>	45	0.31 $\pm$ 0.10	0.68 $\pm$ 0.09	0.66 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.08	2.44 $\pm$ 0.25*	33.15	ND
	100	0.34 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.1	0.66 $\pm$ 0.2	0.70 $\pm$ 0.2	0.74 $\pm$ 0.2	2.37 $\pm$ 0.20**	35.07	
<b>12</b>	30	0.20 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.06	1.98 $\pm$ 0.18**	45.75	31.88
	45	0.11 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.04	1.80 $\pm$ 0.07**	50.68	
	60	0.15 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.09	0.35 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.20**	70.10	
	100	0.34 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.01**	75.70	
<b>13</b>	45	0.27 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.06	0.62 $\pm$ 0.07	2.35 $\pm$ 0.24*	35.62	53.25
	60	0.33 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.12**	62.33	
	100	0.28 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.09**	75.30	
Ind	2.5	0.36 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.05	3.24 $\pm$ 0.20*	11.23	6.68
	5.0	0.28 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.07	0.79 $\pm$ 0.08	0.82 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.07	2.78 $\pm$ 0.25**	23.80	
	7.5	0.18 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.08	0.53 $\pm$ 0.09	0.63 $\pm$ 0.07	1.78 $\pm$ 0.26**	51.23	
	10.0	0.16 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.02**	77.67	

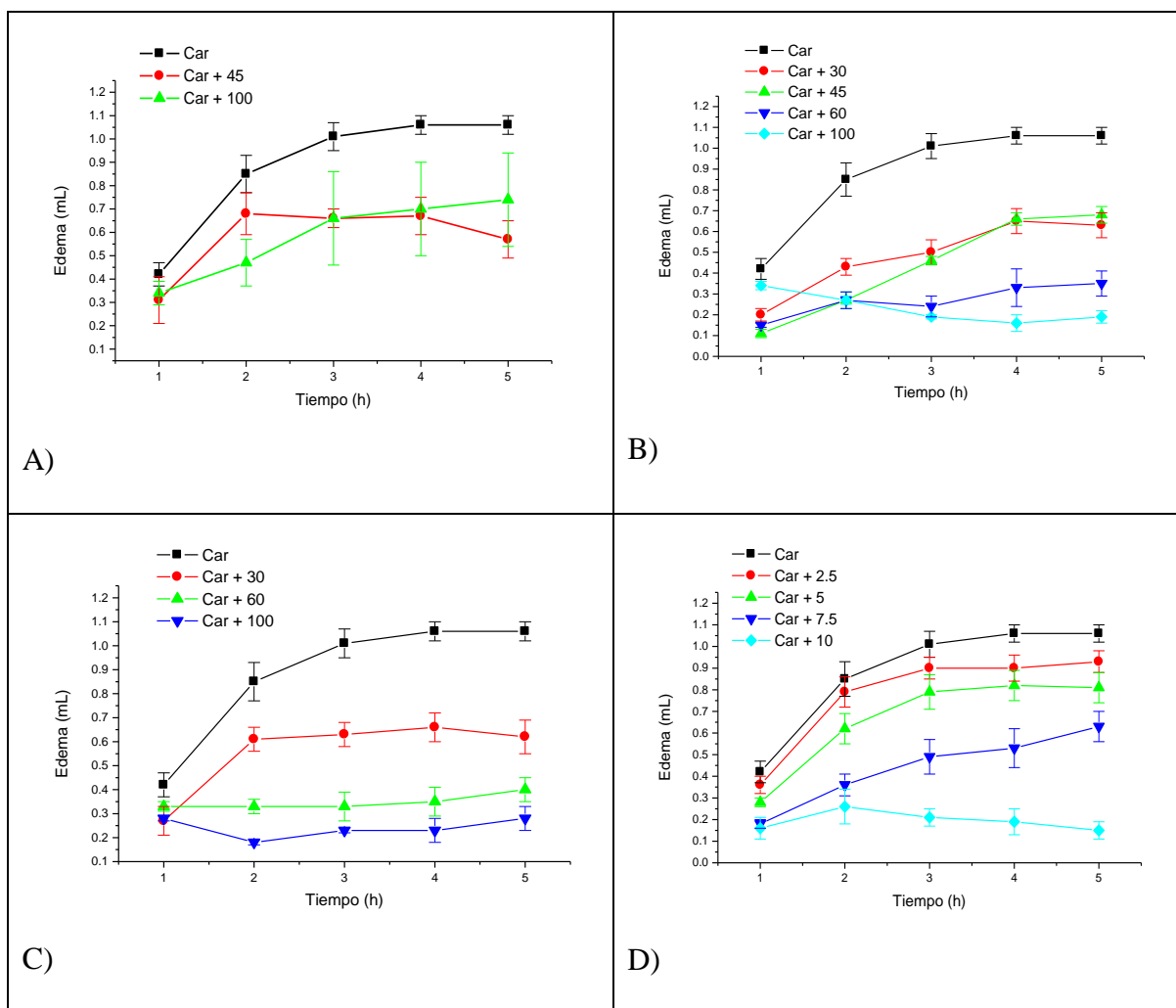
En este experimento se utilizó indometacina como fármaco de referencia evaluada en un intervalo de dosis entre 2.5 y 10.0 mg/Kg. El efecto anti-inflamatorio de

indometacina mostró un comportamiento dosis-dependiente, e inhibió un 77.67 % el área bajo la curva con respecto al grupo control a una dosis de 10 mg/Kg, con una DE<sub>50</sub> de 6.68 mg/Kg.

Los metabolitos secundarios chichipegina (**36**), peniocerol (**12**) y macdougallina (**13**) mostraron resultados variados en este modelo. **36** mostró una inhibición máxima del área bajo la curva de 35.07 % a una dosis de 100 mg/Kg, la cual no resultó estadísticamente significativa comparada con el 33.15 % a una dosis de 45 mg/Kg, debido a esto, no fue posible obtener el valor de DE<sub>50</sub> (ver Figura 18).

Por otro lado, **12** y **13** mostraron una inhibición máxima del edema comparable con indometacina. A una dosis de 100 mg/Kg peniocerol y macdougallina inhibieron el área bajo la curva un 75.70 y 75.30 % respectivamente, valores que no muestran diferencia estadística con el 77.67 % mostrado por indometacina. Además, mostraron también un comportamiento dosis-dependiente, con valores de DE<sub>50</sub> de 31.88 y 53.25 mg/Kg respectivamente. El porcentaje de inhibición de edema de estos dos compuestos fue muy similar al que mostró indometacina a una dosis de 10 mg/Kg, por lo que podemos asegurar que indometacina es más potente que los dos esteroides aislados de *M. geometrizans*, sin embargo las tres sustancias tienen un efecto máximo similar del 75.3 al 77.67 %. A pesar de su excelente actividad antiinflamatoria, indometacina muestra una dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de 13 mg/Kg por vía intraperitoneal en rata (Material Safety Data Sheet, 2011), mientras que **12** tiene una DL<sub>50</sub> mayor a 200 mg/Kg (datos no mostrados), por lo que en ese sentido,

**12** resulta una sustancia antiinflamatoria más segura que indometacina, con un efecto máximo muy similar.



**Figura 18.** Efectos de chichipegénina **36** (A), peniocerol **12** (B), macdougallina **13** (C) e indometacina (D) a lo largo del tiempo y a las diferentes dosis evaluadas. Cada punto representa el edema promedio  $\pm$  EEM; n= 6-9 animales.

A las diferentes dosis evaluadas, **12** parece tener dos tipos de efectos, a dosis bajas de 30 y 45 mg/Kg a las cuales inhibe el área bajo la curva un 45.75 y 50.68 % respectivamente, mientras que a dosis altas de 60 y 100 mg/Kg inhibe el área bajo la curva 70.1 y 75.7 % respectivamente. Esta dualidad pudiera explicarse en función de los eventos temporales característicos del modelo, por lo tanto la inhibición del edema a bajas dosis sugiere que **12** puede interferir con la liberación mediadores como aminas vasoactivas, o bradicinina; mientras que a dosis altas, los resultados sugieren que el esteroide inhibe la síntesis de prostaglandinas de una forma significativa a partir de las cuatro horas posteriores a la aplicación de la carragenina, mostrando un comportamiento similar al de indometacina.

Esto pudiera sugerir que a dosis altas **12** es un buen inhibidor de prostaglandinas, ya que en este modelo se ha demostrado la participación directa de estos mediadores en la producción de edema a partir de las 3 horas posteriores a la administración de carragenina, como fue mencionado en párrafos anteriores.

#### ***VIII.4. Efecto de peniocerol (12) en hiperalgesia inducida por carragenina***

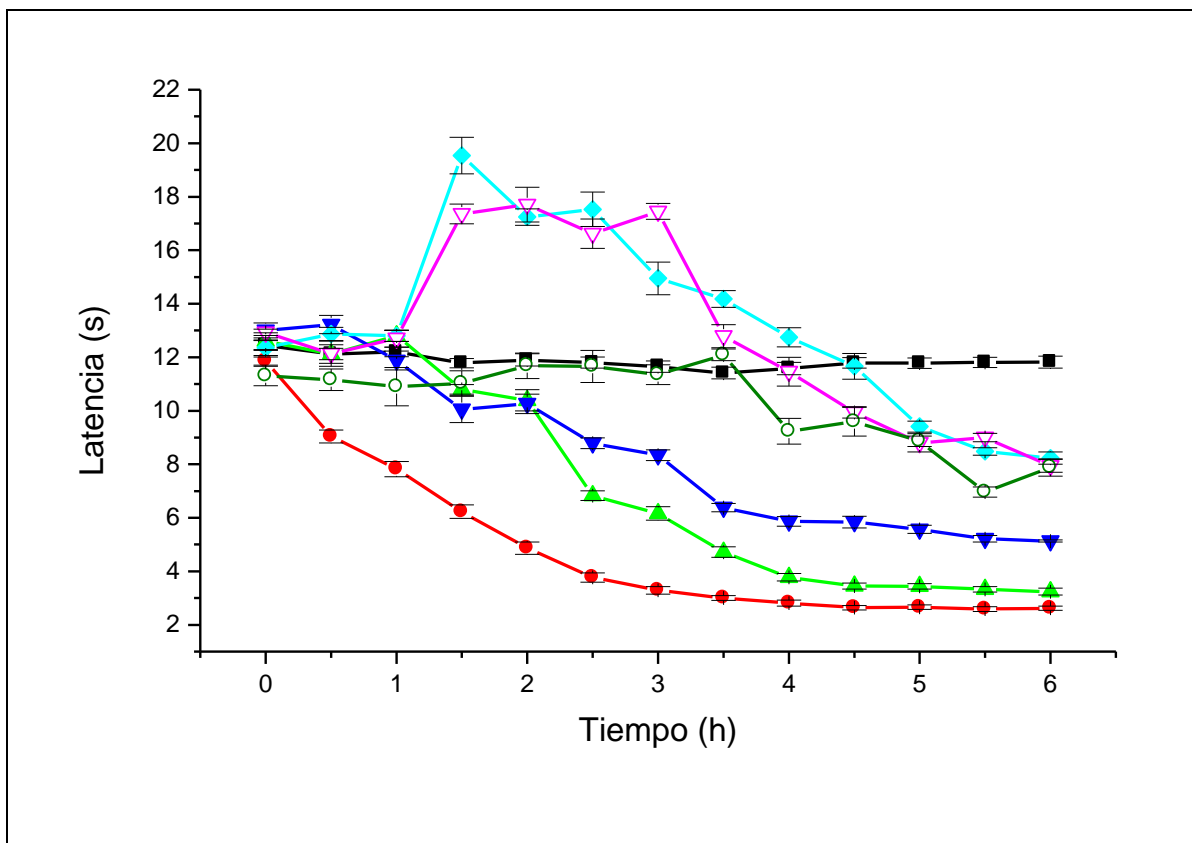
La inyección subplantar de carragenina desencadena una respuesta inflamatoria cuyos mecanismos moleculares ya fueron mencionadas en este trabajo. En esta oportunidad se revisarán los mecanismos por medio de los cuales la carragenina induce una respuesta hiperalgésica en la pata de la rata.

Se ha demostrado que tanto el edema como la respuesta hiperalgésica inducidos por carragenina, están relacionados con niveles elevados de PGE<sub>2</sub> vía COX-2 (Seibert *et al.*, 1994; Svensson y Yaksh, 2002). Según algunos autores, la respuesta hiperalgésica se presenta como consecuencia de la sensibilización de nociceptores por una sobreproducción de mediadores inflamatorios, como la PGE<sub>2</sub> (Zhang *et al.*, 1997; Guay *et al.*, 2004). Esta hiperalgesia resulta en parte de una compleja cascada de eventos promovidos por la activación de receptores espinales de NK-1 y NMDA inducida por la liberación espinal de prostanoïdes, sustancia P y glutamato (Jackson *et al.*, 1995) la activación de dichos receptores estimula a la fosfolipasa espinal, además de la actividad de la COX, lo que conlleva la sobreproducción y liberación de prostanoïdes espinales (Yaksh *et al.*, 2001).

En nuestros experimentos, la administración de solución salina isotónica en la región subplantar no modificó el tiempo de latencia del estímulo luminoso como se puede apreciar en la Figura 19. La administración de carragenina, causa una drástica disminución del tiempo de latencia a lo largo del tiempo de observación, llegando a ser constante a partir

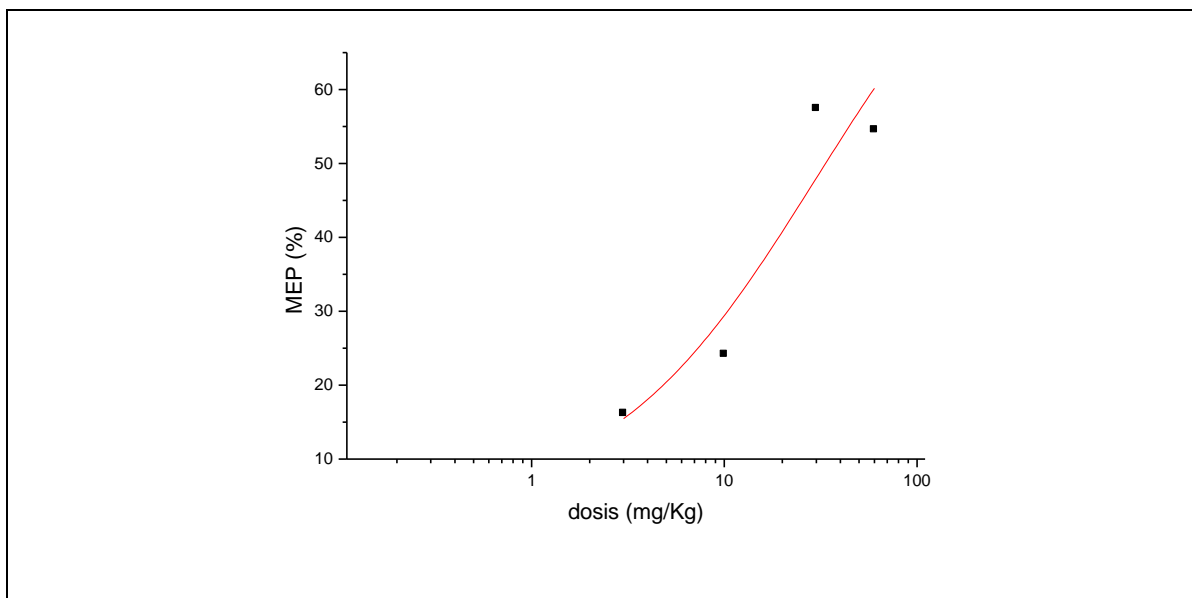


de las 4 horas, con una diferencia de casi 10 segundos con respecto al grupo tratado con solución salina. La administración *i.p.* de peniocerol una hora previa a la administración de carragenina, provocó el aumento del tiempo de latencia de una forma dosis-dependiente. Cuando se administraron dosis de 30 ó 60 mg/Kg de **12**, prácticamente no existe diferencia en el efecto entre ambos tratamientos, pero si con respecto al efecto mostrado por carragenina, frente a la cual mostró una potente actividad anti-hiperalgésica a las dosis mencionadas. A partir de la primera hora posterior a la aplicación de carragenina, **12** a una dosis de 30 mg/Kg aumentó el tiempo de latencia hasta casi 20 segundos en el máximo de la curva, casi ocho segundos más que el control administrado con solución salina y 14 segundos con respecto a carragenina sola. A pesar de que estas diferencias pudieran sugerir una acción sobre otro tipo de receptores de dolor, existen en la literatura ejemplos de otros AINEs como meloxicam, que presentan un comportamiento similar y su principal mecanismo de acción es la inhibición de COX, por lo que se descarta otro tipo de actividad de **12** que pudiera reflejarse en este modelo (Aguilar-Mariscal *et al.*, 2006). A la dosis de 30 mg/Kg los tiempos de latencia de **12** tienen el mismo comportamiento que ketorolaco a 10 mg/Kg a partir de las 4 horas de observación, mientras que las curvas no muestran diferencias significativas entre los tres tratamientos. Estos resultados sugieren que a las dosis de 30 y 60 mg/Kg, **12** tiene una actividad similar a la que presenta ketorolaco, el cuál es un inhibidor no selectivo de COX (Zhang *et al.*, 1997; Jett *et al.*, 1999).



**Figura 19.** Efectos de peniocerol (**12**) y ketorolaco en el modelo de hiperalgesia inducida en pata de rata por carragenina a través del tiempo. Basal (■); carragenina (●); peniocerol (**12**): 3 mg/Kg (▲); 10 mg/Kg (▼); 30 mg/Kg (◆); 60 mg/Kg (▽); ketorolaco: 10 mg/kg (○). Cada punto representa el promedio  $\pm$  EEM; n=6-9 animales.

A partir de los datos de área bajo la curva, que reflejan los efectos globales de las sustancias administradas, se calculó el máximo efecto posible (ver Figura 20). A partir de estos datos, se calculó para **12** la  $DE_{50}$  (33.82 mg/Kg), que es muy similar al valor mostrado por **12** en el modelo de inflamación (31.88 mg/Kg), por lo que estos datos sugieren que peniocerol inhibe uno o varios mecanismos involucrados tanto en la respuesta hiperalgésica como inflamatoria con la misma magnitud y que éste mecanismo participa en el mismo espacio y en el mismo tiempo durante ambas respuestas.



**Figura 20.** Porcentaje del Máximo Efecto Posible (MEP) de peniocerol **12** en el modelo de hiperalgesia en pata de rata inducida por carragenina. Datos calculados a partir de los valores de área bajo la curva (ABC) para cada concentración de peniocerol.

Como ya se ha mencionado, el edema, la hiperalgesia y los niveles de prostaglandina  $E_2$  en la pata de la rata se encuentran elevados, mostrando un máximo alrededor de las tres horas posterior de la inyección de carragenina. De acuerdo a la literatura, la hiperalgesia térmica se presenta como una consecuencia de la sensibilización de nociceptores, por una sobreproducción de mediadores inflamatorios principalmente  $PGE_2$ , que activa a receptores acoplados a proteínas G localizados en neuronas espinales intrínsecas (receptores DP y  $EP_2$ ), y neuronas aferentes primarias (receptores  $EP_1$ ,  $EP_3$  e IP) (Stock *et al.*, 2000; Rowlands *et al.*, 2001; Vanegas y Schaible, 2001).

En este modelo de hiperalgesia, COX-2 es la enzima que mayoritariamente contribuye a la producción de  $PGE_2$  (Yaksh *et al.*, 2001), mientras que en el modelo de dolor abdominal inducido por ácido acético diluido, COX-1 es la enzima responsable de la

producción del mismo mediador (Ballou *et al.*, 2000), modelo en el cual **12** resulto inactivo (datos no mostrados), por lo que a partir de los resultados podemos inferir que este compuesto puede estar interfiriendo con la síntesis de PGE<sub>2</sub> vía interferencia con la actividad de COX-2, o bien mediante algún otro mecanismo molecular como la regulación transcripcional de COX-2 como se ha demostrado en otras oportunidades (Ballou *et al.*, 2000) y se deberán realizar experimentos destinados a demostrar o rechazar esta hipótesis.

### **VIII.5. Producción del óxido nítrico en macrófagos de ratón**

El óxido nítrico (ON) es un radical libre gaseoso que desempeña importantes funciones en procesos fisiológicos y patológicos en humanos. La implicación del ON en el funcionamiento de los sistemas inmune, cardiovascular y nervioso ha sido ampliamente detallada, incluyendo su participación en eventos como la vasodilatación, control de las infecciones bacterianas y virales, la neurotransmisión, el aprendizaje, la memoria y la peristalsis, hasta en la erección del pene (Bredt y Snyder, 1994; Ignarro *et al.*, 1999; Weisinger, 2001). Este gas es producido en cantidades abundantes bajo condiciones asociadas a procesos inflamatorios, y es reconocido como un factor de riesgo para el surgimiento y desarrollo del cáncer (Wink *et al.*, 2008).

Su síntesis es llevada a cabo por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), cuyo único sustrato fisiológico parece ser el aminoácido L-arginina. En dicha reacción una molécula de L-arginina es transformada en una molécula de L-citrulina y una molécula de ON. Para la síntesis del ON, además del sustrato L-arginina, se requiere de la presencia de calmodulina y de 4 cofactores: mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavin adenina (FAD), tetrahidrobiopterina (THB) y dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH) (Schmidt *et al.*, 1988).

En la familia de la NOS, la isoforma inducible (*i*-NOS) está involucrada en el proceso de la inflamación y a posteriores procesos patológicos que involucran la sobreproducción de ON. Por lo tanto, la inhibición de la *i*-NOS es un blanco importante

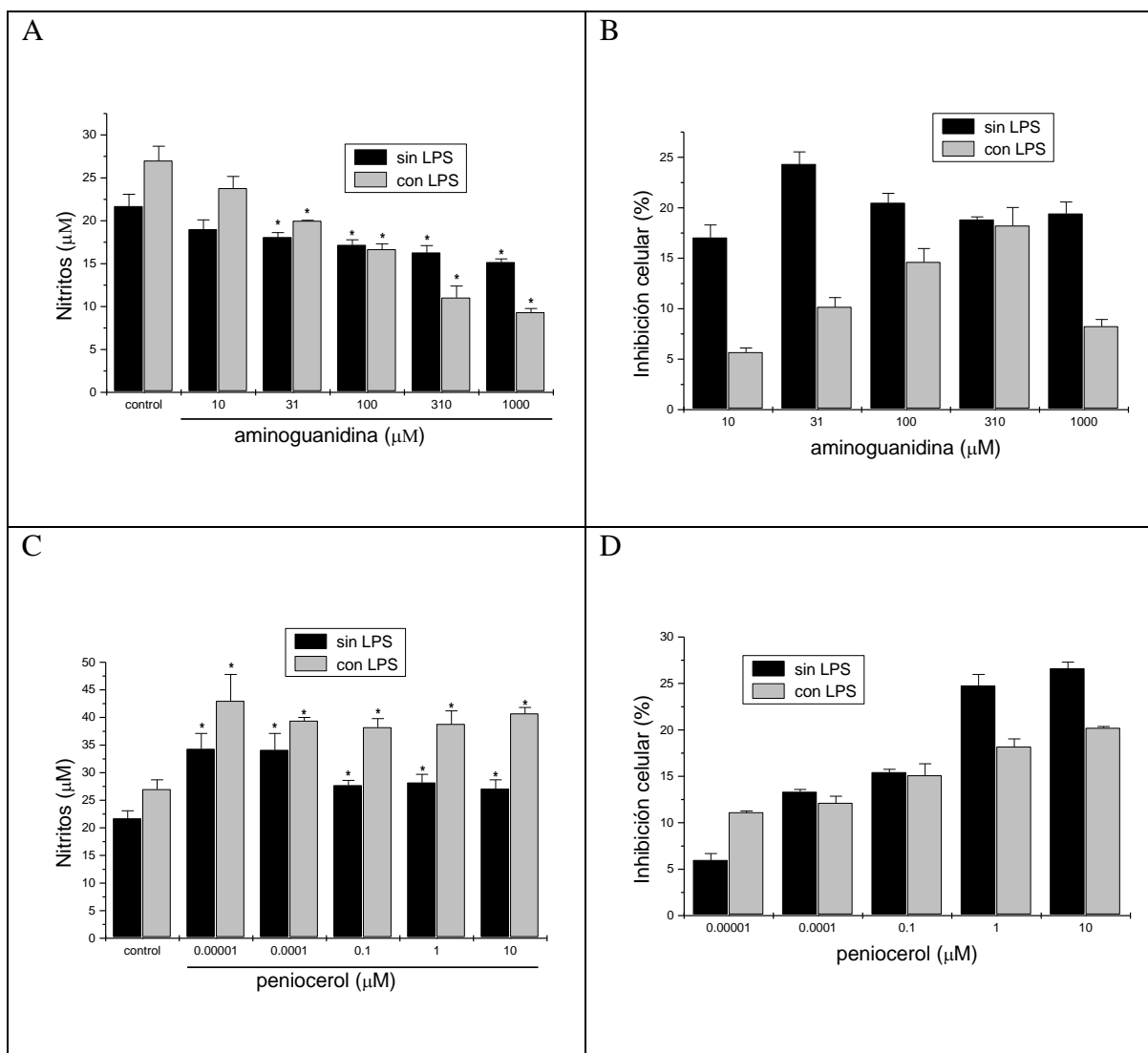
para tratar de controlar las enfermedades inflamatorias, incluyendo la carcinogénesis (Hofseth, 2008). También cada vez más pruebas sugieren que hay una relación entre las rutas biosintéticas del ON y PG que involucra la regulación de los productos finales de estas vías, nucleótidos cíclicos (Mollace *et al.*, 2005), así como también el peroxinitrito, el cual es el producto generado por el acoplamiento de del superóxido y el ON en una reacción que involucra radicales libres (Landino *et al.*, 1996). Sin embargo, el efecto final de estas interacciones es aún confuso y se requiere de mayor investigación al respecto para poder comprender mejor esta interacción.

Al ser el ON una molécula tan reactiva y que se degrada con rapidez con otros elementos, su cuantificación directa en fluidos biológicos no ha sido sencilla; se prefiere su cuantificación indirecta, lo cual puede lograrse al medir sus metabolitos fisiológicos, es decir, los nitratos y nitritos ya que se acepta que prácticamente todos los nitratos y nitritos plasmáticos y/o urinarios en el humano se derivan de la ruta L-arginina/NO (Rhodes *et al.*, 1995). Un método para evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos químicos contra la *i*-NOS es el uso de cultivos macrófagos aislados del peritoneo de ratón, estimulados con lipopolisacárido (LPS) (Harinantenaina *et al.*, 2005).

Los metabolitos secundarios **12**, **13** y **36** resultaron ser tóxicos para los macrófagos a dosis mayores de 10  $\mu$ M (40 a 60% de viabilidad). Debido a lo anterior, fueron evaluados en un rango de dosis de  $1 \times 10^{-5}$ - 10  $\mu$ M con lo que permanecieron con un intervalo del 80 al 90 % de viabilidad. Nuestros resultados muestran que los cultivos celulares tratados con los compuestos **36** y **13** no modificaron la producción de ON (datos no mostrados). Se utilizó

aminoguanidina como control positivo, ya que se sabe que esta sustancia a altas concentraciones es un inhibidor de *i*-NOS (Zhao *et al.*, 1996).

Los efectos de peniocerol (**12**) y aminoguanidina en la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos, se muestran a continuación en la Figura 21.



**Figura 21.** Efectos de aminoguanidina y peniocerol **12** en la producción del óxido nítrico (ON) en cultivos de macrófagos murinos *in vitro*. Producción de ON: aminoguanidina (A); peniocerol (C). Inhibición celular: aminoguanidina (B); peniocerol (D). Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM; n= 3. \*  $P < 0.01$ .

Los resultados muestran que peniocerol (**12**) aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) la producción de ON, tanto en macrófagos en reposo, como en los macrófagos activados con LPS. Aunque la cantidad de nitritos liberada por las células tratadas con LPS fue significativamente diferente de la de las células en reposo, la producción de nitritos se incrementó en ambos casos. Es importante señalar que la actividad mostrada por peniocerol no era dependiente de la dosis.

Estos datos indican una producción constante de ON en todas las concentraciones probadas. Una tendencia similar es mostrada por el ácido masticadienólico y por el ácido-3 $\alpha$  masticadienólico, los cuales son los triterpenos mayoritarios presentes en cuachalalate (*Amphyterigium adstringens*) un agente anti-inflamatorio muy popular en la medicina tradicional mexicana (Oviedo-Chávez *et al.*, 2005), y contrastan con los resultados obtenidos previamente para otros triterpenos, entre ellos el ácido ursólico y ácido oleanólico, que demuestran que dichas sustancias sí pueden modular la producción de este gas (Youa *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha propuesto que el ON a bajas concentraciones, puede comportarse como proangiogénico y protumoral, mientras que a dosis más altas de ON puede tener el efecto contrario (Alexandrova *et al.*, 2001). Por lo tanto, es posible, que la actividad biológica de peniocerol podría estar relacionada con el aumento de la producción de ON.



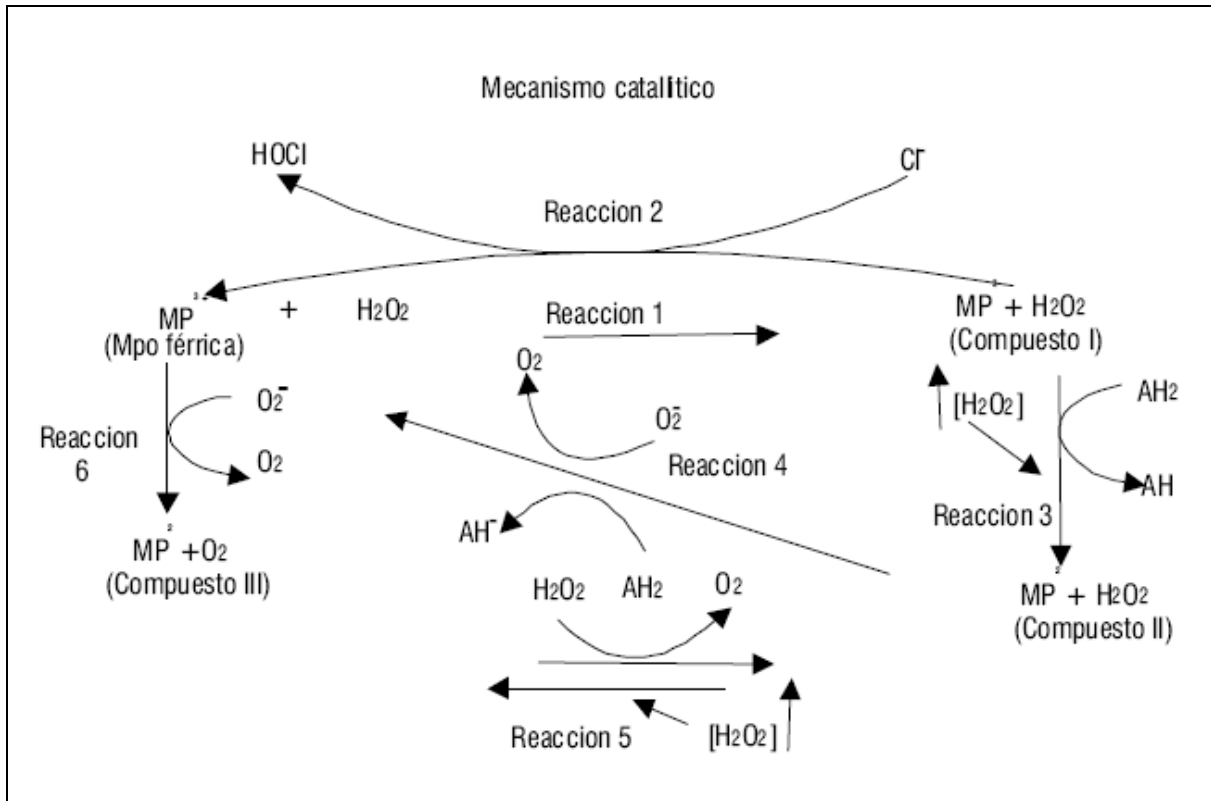
## ***VIII.6. Efecto del peniocerol (12) en la actividad de la enzima mieloperoxidasa***

Durante un evento en el que se produce inflamación, los leucocitos polimorfonucleares (también llamados neutrófilos) son las primeras células que son reclutadas desde la sangre periférica hasta el sitio de inflamación, seguidas tiempo después por monocitos. La infiltración de estas células al tejido infectado o dañado está regulada y mediada por moléculas de adhesión, citocinas y componentes de la matriz extracelular tanto en las paredes de los vasos sanguíneos como en el tejido adyacente (Muller, 2002; Taylor y Gallo, 2006). Una de las funciones de los polimorfonucleares es la liberación de proteínas y generación de radicales libres, los cuales contribuyen a la defensa contra patógenos, a la regulación del proceso inflamatorio y a combatir el daño causado al tejido. Un producto peculiar de los polimorfonucleares es la enzima mieloperoxidasa (MPO) que es almacenada en grandes cantidades en los gránulos azurófiros de estas células (Klebanoff, 2005). La MPO es una glicoproteína tetramérica, constituida por 4 subunidades que forman 2 homodímeros. Cada uno de ellos contiene una subunidad  $\alpha$  (pesada) de aproximadamente 59 kDa y una subunidad  $\beta$  (ligera) de aproximadamente 14 kDa. El peso molecular de la enzima se estima entre 130-150 kDa (Nauseef, 1986). Las subunidades pesadas se unen a través de un enlace bisulfuro simple y a cada una de ellas se le une covalentemente un grupo prostético hemo (Morishita *et al.*, 1986). Estas subunidades se encuentran glicosiladas y contienen entre 2- 4 % de carbohidratos. En cuanto a su actividad catalítica, el sistema MPO-peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )-haluro es un sistema que ha sido bien

estudiado y se conocen detalles de sus mecanismos (Kettle y Winterbourn, 1988; Kettle y Winterbourn, 1994; Kettle *et al.*, 1992).

La MPO reacciona con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  proveniente de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas, formando un complejo enzima-sustrato con una fuerte capacidad oxidativa (reacción 1) (ver Figura 22). Este complejo se combina con un ión haluro, generalmente cloruro, que se oxida de  $\text{Cl}^-$  a  $\text{Cl}^+$  para formar ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) (reacción 2) (Weis *et al.*, 1982; Malle *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003). El compuesto I puede ser reducido a compuesto II por un exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por ejemplo, concentraciones mayores a 20 mM lo transforma parcialmente y mayores de 200 mM completamente, o por la presencia de un agente reductor como el ditiotreitól, cisteína, glutatión y cisteamina (reacción 3). Este compuesto II, a pesar de ser bastante estable puede reducirse a MPO férrica en presencia de un agente reductor o el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (reacción 4) o también puede oxidarse a compuesto III bajo concentraciones elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2-3 mM) (reacción 5).

Por otra parte la MPO nativa puede ser oxidada por el  $\text{O}_2$  a oximieloperoxidasa (compuesto III) (reacción 6) (Svensson, 1988; Arnhold y Flemming, 2010).



**Figura 22.** Representación de los eventos moleculares de la actividad catalítica de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y la formación de ácido hipocloroso (HOCl en la figura). Tomado de García-Morales *et al.*, 1998.

Después de varios experimentos, se demostró que la actividad antimicrobiana de la MPO se debe a su capacidad exclusiva de producir HClO y otros agentes tóxicos (Hurst y Barrette, 1989; Barrette *et al.*, 1989), que crea un microambiente dentro del fagolisosoma del neutrófilo que destruye o inhibe al microorganismo fagocitado (Nauseef *et al.*, 1988; Hansson *et al.*, 2006). Por otro lado, los daños mediados por MPO no se limitan a los microbios intrafagosomales, ya que sustancias como HClO y sus derivados pueden dañar también los tejidos adyacentes del huésped. Así, la MPO se ha implicado en la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias, incluyendo la aterosclerosis, trastornos desmielinizantes del sistema nervioso central y ciertos tumores (Nauseef, 2001).

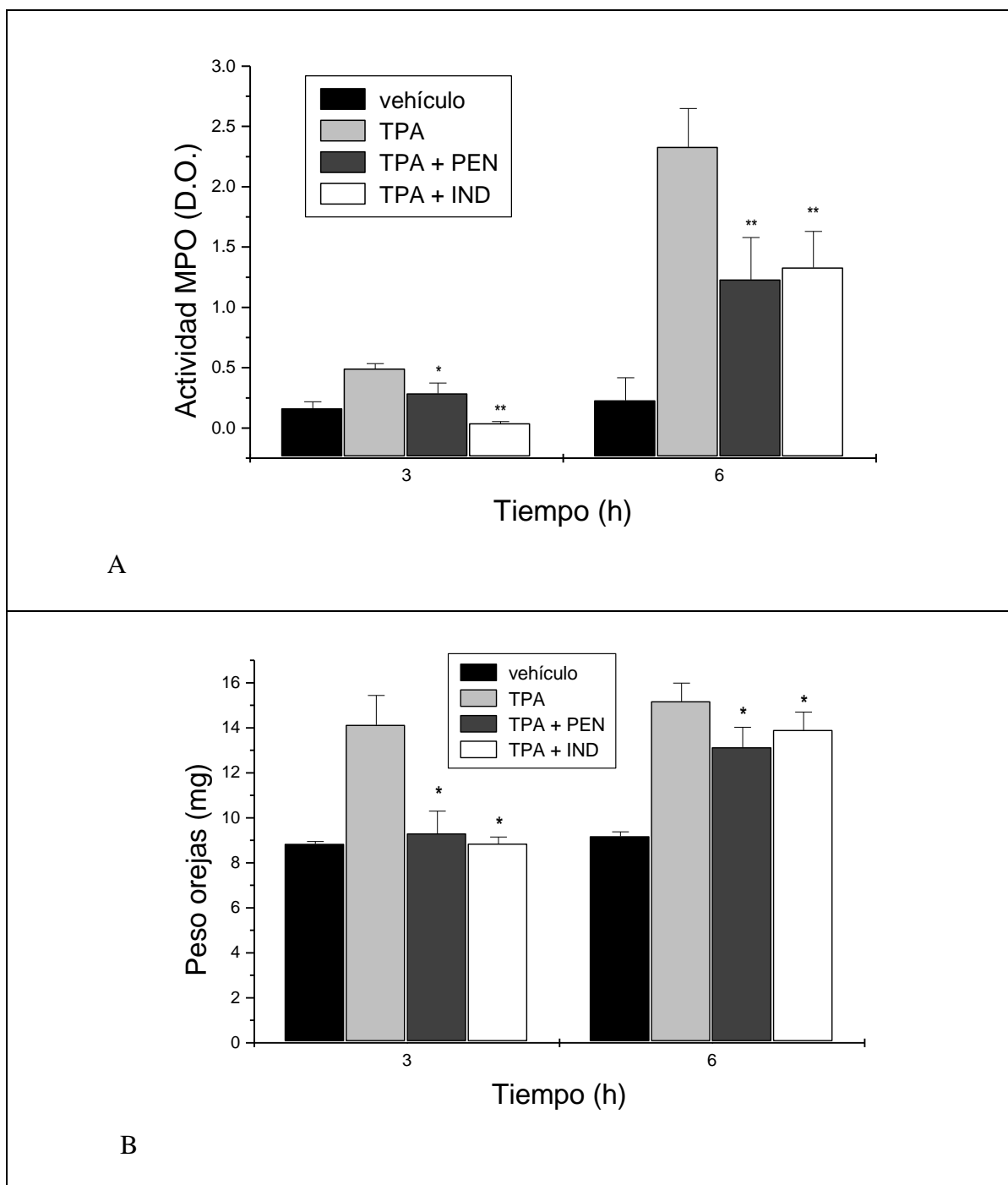
En apoyo de lo anterior, hay pruebas directas de modificaciones en biomoléculas catalizadas por la MPO, incluyendo la oxidación de las lipoproteínas en suero (Hazen *et al.*, 1996; Panasenko *et al.*, 1994). También se han detectado cantidades importantes de MPO en las lesiones ateroscleróticas (Nicholls y Hazen, 2009) y la oxidación de las lipoproteínas catalizada por la MPO ha sido implicada en la evolución de la enfermedad cardiovascular (Hazell *et al.*, 1996; Lau y Baldus, 2006).

Los sitios de inflamación crónica se han asociado con niveles de expresión elevados de MPO (Lefkowitz *et al.*, 1999; Eleuteri *et al.*, 2009) y otras enzimas de la superfamilia de peroxidasas (Ortiz de Montellano, 1992), así como también de su sustrato, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kettle y Winterbourn, 1997). Lo mismo sucede en algunos modelos experimentales de inflamación, en los cuales al producirse un efecto inflamatorio local mediante la aplicación de sustancias irritantes como el TPA, tanto la expresión como la actividad de MPO se incrementan (Ferrari *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1993; Sánchez y Moreno, 1999b; Pugneiró *et al.*, 1998).

En el presente trabajo se aplicó TPA de forma tópica en la oreja derecha de ratones, a un grupo se le administró indometacina, mientras que a otro se le administró peniocerol (12). La mitad de los ratones de ambos grupos se sacrificaron a las 3 horas, mientras que la otra mitad se sacrificaron a las 6 horas. Se evaluó la inflamación en las orejas, seguido de la evaluación de la actividad de la mieloperoxidasa en los mismos tejidos (ver Figura 23).

Éste modelo se ha empleado con frecuencia como bioindicador de la infiltración de polimorfonucleares en el tejido (Bradley *et al.*, 1982; Puigneró y Queralt, 1997; Sánchez y Moreno, 1999b), y también se ha utilizado como bioindicador de la irritación de la piel y la consecuente inflamación causada por agentes irritantes (Trush *et al.*, 1994)

Los resultados indican que TPA es capaz de inducir el aumento de la actividad de la MPO, tanto a las 3 como a las 6 horas posteriores a su aplicación. A las tres horas el TPA induce un aumento de casi dos veces de la actividad basal de MPO, mientras que a las seis horas aumenta casi cinco veces la actividad de esta enzima. Estos resultados están en concordancia con lo reportado con anterioridad para el TPA, sustancia que aumenta la infiltración de polimorfonucleares en el tejido tratado, lo que se refleja en un aumento de la actividad de MPO (Puigneró y Queralt, 1997; Murakawa *et al.*, 2006).



**Figura 23.** Efectos de penicicrol (**12**) e indometacina en la actividad de la MPO evaluada in vitro en muestras de tejido de orejas de ratón tratadas con TPA. Densidad Óptica como indicativo de la actividad de la MPO (A); pesos de las biopsias de las orejas como indicativo de la inflamación inducida por TPA (B). Cada barra representa el promedio  $\pm$  EEM; n= 3; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01.

En este experimento, tanto **12** como indometacina inhibieron la actividad de la MPO, tanto a las tres como también a las seis horas posteriores al tratamiento con TPA. A las 3 horas, indometacina disminuyó la actividad de MPO un 92 % ( $P < 0.01$ ), mientras que **12** inhibió cerca de un 42 % ( $P < 0.05$ ). A las seis horas, **12** inhibió 47.2 % ( $P < 0.01$ ) mientras que indometacina 42.9 % ( $P < 0.01$ ). Los resultados indican que el efecto de indometacina disminuye a lo largo del tiempo, mientras que el efecto de **12** sobre la MPO se mantiene casi constante en las mismas condiciones.

Los resultados también muestran que existe una correlación entre la inhibición de la MPO y la inflamación en las orejas de ratón con ambos tratamientos a las dos horas evaluadas. Es conocido que indometacina inhibe la infiltración de polimorfonucleares (Issekutz, 1983) y así mismo inhibe la formación de HClO, propiedad que comparte con varios AINEs como piroxicam, salicilato, sulindac, ibuprofeno y aspirina. Esta capacidad inhibitoria se correlaciona parcialmente con el rango de dosis terapéuticas anti-inflamatorias de cada fármaco (Shacter *et al.*, 1991). La inhibición de la formación de HClO puede constituir un mecanismo adicional por el que los AINEs reducen el daño en los tejidos con inflamación crónica (Kettle y Winterbourn, 1991). Tomando en cuenta lo anterior, es posible que **12** tenga un efecto similar a indometacina y a otros AINEs, por lo tanto la inhibición de la infiltración celular y posiblemente la inhibición de la formación de HClO sean mecanismos que expliquen en parte la inhibición de la inflamación de este esterol.

### VIII.7. Inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano

La actividad de inhibición de la proliferación celular de líneas de cáncer humano de los compuestos **12**, **13** y **36**, sus derivados acetilados **12Ac**, **13Ac** y **36Ac** y doxorubicina se evaluó en un conjunto de cinco líneas celulares de tumores humanos. Los resultados se resumen en la Tabla 7 expresados como las concentraciones inhibitoria 50 % (IC<sub>50</sub> μM ± EEM).

**Tabla 7.** Efectos de los compuestos aislados de *M. geometrizans*, sus derivados acetilados y doxorubicina en la proliferación de líneas celulares de cáncer humano. Los datos representan el promedio de experimentos independientes ± EEM. Los valores de Concentración Inhibitoria 50 % (CI<sub>50</sub>) se obtuvieron de la interpolación de curvas dosis-respuesta. ND= no determinado; Los valores > 50 se consideran inactivos; NA= no activo.

Grupo	Líneas celulares de cáncer humano / Valores de CI <sub>50</sub> (μM)				
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7
<b>36</b>	>50	>50	>50	>50	>50
<b>12</b>	24.73 ± 3.9	19.35 ± 0.45	10.37 ± 0.73	10.87 ± 2.36	10.17 ± 0.79
<b>13</b>	ND	20.78 ± 0.79	7.50 ± 0.1	17.30 ± 0.22	23.28 ± 0.17
<b>36Ac</b>	24.59 ± 1.71	>50	8.26 ± 0.28	12.67 ± 0.68	12.39 ± 0.416
<b>12Ac</b>	>50	>50	NA	NA	>50
<b>13Ac</b>	>50	>50	>50	NA	>50
Dox	0.09 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.01



De los metabolitos secundarios evaluados, **36** no fue capaz de inhibir el crecimiento de las células cancerosas más de 50% a 200 mM, por lo que se considera no tóxica. Por otra parte, los compuestos **12** y **13** mostraron moderada actividad citotóxica contra todas las líneas celulares de cáncer con valores de IC<sub>50</sub> de 7.5 a 24.73 μM. No hubo diferencias significativas en los valores de IC<sub>50</sub> entre ambos esteroides, lo que demuestra que la presencia de un grupo α-metilo en C-14 en **13** no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular comparándolo con **12** que carece de dicho grupo.

Sin embargo, en todos los casos, los valores de IC<sub>50</sub> son un orden de magnitud superior a las expuestas por la doxorubicina, por lo que estos compuestos tienen baja toxicidad contra las líneas celulares utilizadas.

Se ha informado previamente que los derivados oxidados del colesterol (Higley y Taylor, 1984) y algunos fitoesteroides (especialmente dioles y trioles) son muy tóxicos a una serie de cultivos de líneas celulares humanas tumorales y normales. Esta toxicidad se ha demostrado que se produce a través de la inducción de la apoptosis en las células (Lordana *et al.*, 2009; Koschutnig *et al.*, 2009; Hovenkamp *et al.*, 2008). Debido a la similitud estructural de los esteroides aislados con los mencionados anteriormente, se puede suponer que el mecanismo de citotoxicidad que presentan peniocerol y macdougallina también es similar.

Por otro lado, también existe en la literatura información de la actividad citotóxica de eritrodiol (**30**), un diol de tipo oleanano relacionado estructuralmente con **36**, para el

cual se demostró que su actividad antiproliferativa contra la línea celular 1321N1 de astrocitoma humano, implicaba la inducción de apoptosis, mediante la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs), la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria, y la activación de la cinasa c-Jun, lo que provoca la inducción de la apoptosis en las células del astrocitoma (Martín *et al.*, 2009). Es probable que al igual que sucedió con los esteroides mencionados en párrafos anteriores, **36**, y su derivado acetilado **36Ac** puedan ejercer un efecto similar.

## IX. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten generar las siguientes conclusiones:

1. La especie *Myrtillocactus geometrizans*, perteneciente a la familia Cactaceae, se utiliza como remedio natural contra procesos inflamatorios, y se comprueba que es una fuente rica de triterpenos en las partes aéreas y de esteroides en la raíz.
2. Los extractos tanto de partes aéreas como de raíz presentan una buena actividad anti-inflamatoria en el modelo de inflamación inducida por TPA.
3. Los extractos tienen varios compuestos anti-inflamatorios, los cuales fueron aislados, purificados y se obtuvo su estructura química en base a la interpretación y comparación de sus datos espectroscópicos, espectrométricos y sus propiedades fisicoquímicas, con aquellos previamente informados.
4. El componente mayoritario del extracto de metanol de las partes aéreas resultó ser chichipegina (**36**), un triterpeno tetrahidroxilado el cual presentó actividad anti-inflamatoria en el modelo de TPA, baja actividad en el modelo de EPP y muy baja actividad citotóxica frente a todas las líneas celulares de cánceres humanos utilizados. Sin embargo, es probable que este compuesto junto con el ácido oleanólico, expliquen la actividad medicinal atribuida a la especie.

5. Peniocerol (**12**) y macdougallina (**13**) son dos esteroides típicos de las cactáceas columnares de México, peculiares en su estructura tipo colesterol, con una doble ligadura interna, y grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 6, los cuales son abundantes en el extracto de metanol de la raíz.
6. Ambos esteroides mostraron una potente actividad anti-inflamatoria en el modelo de TPA, carragenina y una buena citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer humano.
7. Adicionalmente, peniocerol mostró una buena actividad antihiperálgica, comparada con el ketorolaco.
8. Peniocerol mostró una buena actividad inhibitoria de la actividad de la enzima mieloperoxidasa, comparable con la de indometacina, demostrando que es uno de los posibles mecanismos anti-inflamatorios que este compuesto presenta.

## X. Referencias bibliográficas

- Aggarwal, B.B., Vijayalekshmi, R.V., Sung, B. (2009). Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. *Clinical Cancer Research* **15**: 425-430.
- Aguilar, C., Ramírez, G. (1996). Opuntia and Metabolic Control Among Patients with NIDDM. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **1**: 63-64.
- Aguilar-Mariscal, H., Rodriguez-Silverio, J., Torres-Lopez, J.E., Flores-Murrieta, F.J. (2006). Comparison of the Anti-hyperalgesic and Anti-inflammatory Effects of Meloxicam in the Rat. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* **49**: 45-47.
- Akihisa T., Yasukawa K. (2001). Antitumor-promoting and anti-inflammatory activities of triterpenoids and sterols from plants and fungi. In: *Studies in Natural Products Chemistry* **25** (Bioactive Natural Products (Part F)): 43-87.
- Akihisa, T., Yasukawa K., Tokuda H. (2003). Potentially cancer chemopreventive and anti-inflammatory terpenoids from natural sources. In: *Studies in Natural Products Chemistry* **29**(Bioactive Natural Products (Part J)): 73-126.
- Alexandrova, R., Mileva, M., Zvetkova, Y. (2001). Nitric oxide and Cancer. *Experimental Pathology and Parasitology* **4**: 13-17.
- Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M.G., Sica, A., Mantovani, A. (2008). Pathways connecting inflammation and cáncer. *Current Opinion in Genetics & Development* **18**: 3-10.
- Anderson, E.F. (2001). *The Cactus Family*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- Anderson, G.D., Hauser, S.D., McGarity, K.L., Bremer, M.E., Isakson, P.C., Gregory, S.A. (1996). Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *Journal of Clinical Investigation* **97**: 2672-2679.
- Arias, S. (1993). Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* **XLIV**: 109-115.

- Arias, S., Terrazas, T., Arreola-Nava, H.J., Vázquez-Sánchez, M., Cameron, K.M. (2005). Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *Journal of Plant Research* **118**: 317–328.
- Arnhold, A., Flemmig, J., (2010). Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **500**: 92–106.
- Balkwill, F., Charles, K.A., Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* **7**: 211-217.
- Balkwill, F., Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* **357**: 539-545.
- Ballou, L.R., Botting, R.M., Goorha, S., Zhang, J., Vane, J.R. (2000). Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 10272–10276.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., Dennis E.A. (1999). Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **39**:175–89.
- Banno, N., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Tabata, K., Nakamura, Y., Nishimura, R., Kimura, Y., Suzuki, T. (2006). Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 249-253.
- Batis, A.I., Rojas-Aréchiga, M. (2002). El peyote y otros cactus Alucinógenos de México. *Biodiversitas* **40**: 12-17.
- Barrette W.C., Hannum, D.M., Wheeler, W.D., Hurst, J.K. (1989). General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry* **28**: 9172–9178.
- Benitez, E., Dávila, P. (2002). Las cactáceas mexicanas en el contexto de las CITES. *Biodiversitas* **40**: 8-11.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology* **78**: 206-209.
- Brattsand, R., Thalén, A., Roempke, K., Källström, L., Gruvstad, E. (1982). Influence of 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. *Journal of Steroid Biochemistry* **16**: 779-786.

- Bravo-Hollis, H. (1978), Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Bredt, D.S., Synder, S.H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry* **63**: 175-195.
- Brown, S.D., Massingill, J.L., Hodgkins, J.E. (1968). Cactus Alkaloids. *Phytochemistry* **7**: 2031-2036.
- Bruhn, J.G., Bruhn, C. (1973). Alkaloids and ethnobotany of Mexican peyote cacti and related species. *Economic Botany* **27**: 241-251.
- Burret, F., Lebreton, P., Voirin, B. (1982). Les Aglycones Flavoniques de Cactées: Distribution, Signification. *Journal of Natural Products* **45**: 687-693.
- Cameron, G.S., Baldwin, J.K., Klann, R.C., Patrick, K.E., Fischer, S.M. (1991). Tumor-promoting Activity of Ethyl Phenylpropionate. *Cancer Research* **51**:5642-5648.
- Campbell, C.E., Kircher, H.W. (1980). Senita Cactus: a Plant with Interrupted sterol Biosynthetic Pathways. *Phytochemistry* **19**: 2777-2779.
- Casas, A. (2002). Uso y Manejo de Cactáceas Columnares Mesoamericanas. *Biodiversitas* **40**: 18-22.
- Casas, A., Caballero, J., Valiente-Banuet, A. (1999). Use, management and domestication of columnar cacti in south-central Mexico: A historical perspective. *Journal of Ethnobiology* **19**: 71-95.
- Castagnag, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuk, Y. (1982). Direct Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters. *The Journal of Biological Chemistry* **257**: 7847-7851.
- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E.M. (2008). Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 5758-5764.
- Castellar, R., Obón J.M., Alacid, M., Fernández-López, J.A. (2003). Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia* Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 2772-2776.

- Choi, C.Y., You, H.J., Jeong, H.G. (2001). Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production by Oleanolic Acid via Nuclear Factor-kB Activation in Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**: 49-55.
- Chun, K.S., Surh, Y.J. (2004). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochemical Pharmacology* **68**: 1089–1100.
- Colomas, J., Barthe, P., Bulard, C. (1978). Séparation et Identification des Bétalaïnes Synthétisées par les Tissus de Tige de *Myrtillocactus geometrizans* Cultivés “*in vitro*”. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* **87**: 341-346.
- CITES. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. <http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>
- Coussens, L.M., Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-867.
- Correa-Betanzo, J., Jacobb, J.K., Perez-Pereza C., Paliyath G. (2010). Effect of a sodium caseinate edible coating on berry cactus fruit (*Myrtillocactus geometrizans*) phytochemicals. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2010.10.053
- Crofford, L.J., Wilder, R.L., Ristimaki, A.P. Sano, H., Remmers, E.F., Epps, H.R., Hla, T. (1994). Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *Journal of Clinical Investigation* **93**: 1095-1101.
- Cronquist, A. (1968) Evolution and Classification of Flowering Plants. Nelson, London.
- Cruz–Hernández, A., Paredes–López, O. (2010). Enhancement of economical value of nopal and its fruits through biotechnology. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **12**: 110-126.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* **26**: 335-341.
- Di Rosa, M. (1972). Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **24**: 89-102.



- Dirig, D.M., Salami, A., Rathbun, M.L., Ozaki, G.t., Yaksh, T.L. (1997). Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *Journal of Neuroscence Methods* **76**: 183-191.
- Dirsch, V. M., Stuppner, H., Vollmar, A. M. (1998). The Griess Assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extract? *Planta Medica* **64**, 423-426.
- Djerassi, C., Bowers, A., Burstein, S., Estrada, H., Grossman, J., Herran, J., Lemin, A.J., Manjarrez, A., Pakrashi, S.C. (1956). Terpenoids. XXII. Triterpenes from Some Mexican and South American Plants. *Journal of the American Chemical Society* **78**: 2312-2315.
- Djerassi, C., Burstein, S., Estrada, H., Lemin, A.J., Lippman, A. E.; Manjarrez, A.; Monsimer, H.G. (1957). Terpenoids. XXVIII. The triterpene composition of the genus *Myrtillocactus*. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 3525-3528.
- Djerassi, C., Farkas, E., Lemin, A.J., Collins, J.C., Walls, F. (1954). Terpenoids. VI. Dumortierigenin, a new triterpene lactone from the cactus *Lemaireocereus dumortieri*. *Journal of the American Chemical Society* **76**: 2969-2973.
- Djerassi, C., Farkas, E., Liu, L.H., Thomas, G.H. (1955). Terpenoids. XVII. The cactus triterpenes thurberogenin and stellatogenin. *Journal of the American Chemical Society* **77**: 5330-5336.
- Djerassi, C., Geller, L.E., Lemin, A.J. (1953). Terpenoids. I. The triterpenes of the cactus, *Lemaireocereus thurberi*. *Journal of the American Chemical Society* **75**: 2254-2256.
- Djerassi, C., Geller, L.E., Lemin, A.J. (1954). Terpenoids. VIII. The structures of the cactus triterpenes gummosogenin and longispinogenin. *Journal of the American Chemical Society* **76**: 4089-4091.
- Djerassi, C., Henry, J.A., Lemin, A.J., Rios, T., Thomas, G.H. (1956). Terpenoids. XXIV. The structure of the cactus triterpene queretaroic acid. *Journal of the American Chemical Society* **78**: 3783-3787.
- Djerassi, C., Knight, J.C., Brockmann, H. (1964). Neue Sterine aus dem Kaktus *Wilcoxia viperina*. *Chemische Berichte* **97**: 3118–3130.
- Djerassi, C., Krakower, G.W., Lemin, A.J., Liu, L.H., Mills, J.S., Villotti, R. (1958). The Neutral Constituents of the Cactus *Lophocereus schottii*. The Structure of Lophenol

- 4 $\alpha$ -Methyl- $\Delta$ 7-cholesten-3 $\beta$ -ol, A Link in Sterol Biogenesis. *Journal of the American Chemical Society* **80**: 6284–6292.
- Djerassi, C., Lippman, A.E. (1954). Terpenoids. X. The triterpenes of the cactus *Lemaireocereus hystrix*. *Journal of the American Chemical Society* **76**: 5780-5781.
- Djerassi, C., Lippman, A.E. (1955). Terpenoids. XIII. The structures of the cactus triterpenes machaeric acid and machaerinic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**: 1825-1828.
- Djerassi, C., Liu, L.H., Farkas, E., Lippman, A.E., Lemin, A.J., Geller, L.E., McDonald, R.N., Taylor, B.J. (1955). Terpenoids. XI. Investigation of nine cactus species. Isolation of two new triterpenes, stellatogenin and Machaeric acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**: 1200-1203.
- Djerassi, C., McDonald, R.M., Lemin, A.J. (1953). Terpenoids. III. The isolation of erythrodiol, oleanolic acid, and a new triterpene triol, longispinogenin, from the cactus *Lemaireocereus longispinus*. *Journal of the American Chemical Society* **75**: 5940-5942.
- Djerassi, C., Mills, J.S. (1958). Terpenoids. XXXII. The structure of the cactus triterpene treleasegenic acid. Ring conformational alterations in a pentacyclic triterpene. *Journal of the American Chemical Society* **80**: 1236-1243.
- Djerassi, C., Monsimer, H.G. (1957). Terpenoids. XXVII. The structure of the cactus triterpene myrtillogenic acid. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 2901-2905.
- Djerassi, C., Murray, R.D.H., Villotti, R. (1961). The structure of the cactus sterol, peniocerol (cholest-8-ene-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -diol). *Proceedings of the Chemical Society* 450.
- Djerassi, C., Murray, R.D.H., Villotti, R. (1965). The structure of the cactus sterol, peniocerol (cholest-8-ene-3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -diol). *Journal of the Chemical Society* 1160-1165.
- Djerassi, C., Robinson, C.H., Thomas, D.B. (1956). Terpenoids. XXV. The structure of the cactus triterpene dumortierigenin. *Journal of the American Chemical Society* **78**: 5685-5691.
- Djerassi, C., Thomas, G.H. (1954). Terpenoids. XII. Constitution of the cactus triterpene cochalic acid. *Chemistry & Industry* 1354.

- Djerassi, C., Thomas, G.H., Monsimer, H. (1955). Terpenoids. XVI. The constitution of the cactus triterpene cochalic acid. Partial reductions of methyl diketochinocystate. *Journal of the American Chemical Society* **77**: 3579-3582.
- Djerassi, C., Wilkinson, D.I., Knight, J.C. (1963). The structure of the Cactus Sterol Macdougallin (14 $\alpha$ -Methyl- $\Delta$ 8-cholestene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol). A Novel Link in Sterol Biogenesis. *Journal of the American Chemical Society* **85**: 835.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., Matias-Guiu, X. (2005). NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv* **446**: 475–482.
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* **23**: 394–411.
- Eggert, H., Djerassi, C. (1981). Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Monounsaturated Steroids. Evaluation of Rules for Predicting Their Chemical Shifts. *Journal of Organic Chemistry* **46**: 5399-5401.
- Eleuteri, E., Di Stefano, A., Ricciardolo, F.L., Magno, F., Gnemmi, I., Colombo, M., Anzalone, R., Cappello, F., La Rocca, G., Genta, F.T., Zummo, G., Giannuzzi, P. (2009). Increased nitrotyrosine plasma levels in relation to systemic markers of inflammation and myeloperoxidase in chronic heart failure. *International Journal of Cardiology* **135**: 386-90.
- Ferrari, S., Tagliafico, E., Ceccherelli, G., Selleri, L., Calabretta, B., Donelli, A., Temperani, P., Sarti, M., Sacchi, S., Emilia, G. (1989). Expression of the myeloperoxidase gene in acute and chronic myeloid leukemias: relationship to the expression of cell cycle-related genes. *Leukemia* **3**: 423-430.
- Feugang, J.M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F.C., Zou, C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia spp.*) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience* **11**: 2574-2589.
- Fitzpatrick, B., Mehibel, M., Cowen, R.L., Stratford, I.J. (2008). *i*-NOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric Oxide* **19**: 217-224.
- Flores-Ortiz C.M., Dávila, P., Portilla, L.B.H. (2003). Alkaloids from *Neobuxbaumia* species (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 581-585.

- Flores-Rosete, G., Martínez-Vázquez, M. (2008), Anti-inflammatory and cytotoxic cycloartanes from guayule (*Parthenium argentatum*). *Natural Products Communications* **3**: 413-422.
- Fogleman, J.C., Armstrong, L. (1989). Ecological aspects of Cactus Triterpene glycosides I. Their effect on fitness components of *Drosophila mojavensis*. *Journal of Chemical Ecology* **15**: 663-676.
- Fogleman, J.C., Danielson, P.B. (2001). Chemical Interactions in the Cactus-Microorganism-Drosophila model system of the sonoran desert. *American Zoologist* **41**: 877-889.
- Fogleman, J.C., Duperret, S.M., Kircher, H.W. (1986). The role of phytosterols in host plant utilization by cactophilic *Drosophila*. *Lipids* **21**: 92-96.
- García-Leme, J., Hamamura, L., Leite, M.P., Rocha, S.M. (1973). Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of cargeenin and by heating. *British Journal of Pharmacology* **48**: 88-96.
- García-Morales, O.H., Pereira-Roche N., Flores-Sánchez, R.M. (1998). Enzimas Generadoras de Especies Reactivas del Oxígeno: Mieloperoxidasa. *Revista Cubana de Investigación Biomedica* **17**: 190-197.
- Gautam, R., Jachak, S.M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews* **29**: 767-820.
- Gibson, A.C., Horak, K.E. (1978). Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Annales of the Missouri Botanical Garden* **65**: 999-1057.
- Giner-Larza, E.M., Máñez, S., Recio, M.C., Giner, R.M., Prieto, J.M., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J.L. (2001). Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. *European Journal of Pharmacology* **428**: 137-143.
- Giuliano, F., Warner, T.D. (2002). Origins of Prostaglandin E2: Involvements of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in Human and Rat Systems. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **303**: 1001-1006.
- Granados-Sánchez, D., Hernández-García, M.A., López-Ríos, G.F. (2004). Estudio integral del valle de Tehuacán-Cuicatlán: recursos genéticos de plantas. En: Chávez-Servia,

- J.L., J. Tuxill y D.I. Jarvis (eds). Manejo de la diversidad de los cultivos en los agroecosistemas tradicionales. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia.
- Griffiths, R.J. (1999). Prostaglandins and Inflammation. En: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Gallin, J.I., Snyderman, R. (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins.
- Guay, J., Bateman, K., Gordon, R., Mancini, J., Riendeau, D. (2004). Carrageenan-induced Paw Edema in Rat Elicits a Predominant Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) Response in the Central Nervous System Associated with the Induction of Microsomal PGE<sub>2</sub> Synthase-1. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 24866–24872.
- Guzmán, U., Arias, S., Dávila, P. (2007). Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México.
- Guzmán-Maldonado, S.H., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., Brat, P. (2010). Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food Chemistry* **121**: 381-386.
- Hamaguchi, K., Kuwata, H., Yoshihara, K., Masuda, S., Shimbara, S., Oh-ishi, S., Murakami, M., Kudo, I. (2003). Induction of distinct sets of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in rodents during inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1635**: 37– 47.
- Handy, R.L., Moore, P.K. (1998). Effect of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology* **279**: 37-43.
- Hansson, M., Olsson, I., Nauseef, W.M. (2006). Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **445**: 214-224.
- Hargreaves, K., Duhner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**: 77-88.
- Harinantenaina, L., Quang, D.N., Takeshi, N., Hashimoto, T., Kohchi, C., Soma, G., Asakawa, Y. (2005). Bis(bibenzyls) from Liverworts Inhibit Lipopolysaccharide-

- Induced Inducible NOS in RAW 264.7 Cells: A Study of Structure-Activity Relationships and Molecular Mechanism. *Journal of Natural Products* **68**: 1779-1781.
- Harizi, H., Corcuff, J.B., Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine* **14**: 461–469.
- Hazell, L.J., Arnold, L., Flowers, D., Waeg, G., Malle, E., Stocker, R. (1996). Presence of Hypochlorite-modified Proteins in Human Atherosclerotic Lesions. *Journal of Clinical Investigation* **97**: 1535–1544.
- Hazen, S.L., Hsu, F.F., Duffin, K., Heinecke, J.W. (1996). Molecular Chlorine Generated by the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide-Chloride System of Phagocytes Converts Low Density Lipoprotein Cholesterol into a Family of Chlorinated Sterols. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 23080-23088.
- Hecker, E. (1968). Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Research* **28**: 2338-2349.
- Hernández, H., Godínez, H. (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* **26**: 33-52.
- Hernández-López, D., Vaillant, F., Reynoso-Camacho, R., Guzman-Maldonado, S.H. (2008). *Myrtillocactus* (Cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruits. *Fruits* **63**: 269-276.
- Hernández-Pérez, M., Sánchez-Mateo, C.C., Montalbetti-Moreno, Y., Rabanal, R.M. (2004). Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 279–284.
- Heyl, G. (1901). Ueber das Vorkommen von Alkaloiden und Saponinen in Cacteen. *Archiv der Pharmazie* **239**: 451-473. doi: 10.1002/ardp.19012390607
- Higley, N.A., Taylor, S.L. (1984). The steatotic and cytotoxic effects of cholesterol oxides in cultured L cells. *Food and Chemical Toxicology* **22**: 983-992.
- Hofseth, L.J. (2008). Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. *Cancer Letters* **268**: 10-30.

- Holden, N.S., Squires, P.E., Kaur, M., Bland, R., Jones, C.E., Newton R. (2008). Phorbol ester-stimulated NF- $\kappa$ B-dependent transcription: Roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cellular Signalling* **20**: 1338-1348.
- Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lütjohann, D., Mensink, R.P., Trautwein, E.A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research* **47**: 37-49.
- Hu, Z.B., Ma, W., Uphoff, C.C., Metge, K., Gignac, S.M., Drexler, H.G. (1993) Myeloperoxidase: expression and modulation in a large panel of human leukemia-lymphoma cell lines. *Blood* **82**: 1599-1607.
- Huguet, A.I., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M., Ríos, J.L. (2000). Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents. *European Journal of Pharmacology* **410**: 69–81.
- Hurst, J.K., Barrette, W.C. (1989). Leukocytic Oxygen Activation and Microbicidal Oxidative Toxin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **24**: 271-328.
- Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signalling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **34**: 879-86.
- Imai, T., Okazaki, S., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Yuasa, H. (2006). Triterpenoid saponins from cultural plants of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae). *Journal of Natural Medicines* **60**: 49-53.
- Issekutz, A.C. (1983). Comparison of the effects of glucocorticoid and indomethacin treatment on the acute inflammatory reaction in rabbits. *Immunopharmacology* **5**: 183-195.
- Jackson, D.L., Graff, C.B., Richardson, J.D., Hargreaves, K.M. (1995). Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology* **284**: 321-325.
- Jett, M.F., Ramesha, C.S., Brown, C.D., Chiu, S., Emmett, C., Voronin, T., Sun, T., O'Yang, C., Hunter, J.C., Eglen, R.M., Johnson, R.M. (1999). Characterization of the

- Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ketorolac and Its Enantiomers in the Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**: 1288-1297.
- Jiang, J., Li, Y., Chen, Z., Min, Z., Lou, F. (2006). Two novel C<sub>29</sub>-5 $\beta$ -sterols from the stems of *Opuntia dillenii*. *Steroids* **71**: 1073-1077.
- Jolad, S., Steelink, C. (1969). Thurberin, a new pentacyclic triterpene from organ-pipe cactus. *Journal of Organic Chemistry* **34**: 1367-1369.
- Karin, M., Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews in Immunology* **5**: 749-759.
- Karin, M., Liu, Z., Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 240-246.
- Kasprzyk, Z., Pyrek, J., Jolad, S.D., Steelink, C. (1970). Identity of calenduladiol and thurberin: a lupenediol found in marigold flowers and organ pipe cactus. *Phytochemistry* **9**: 2065-2066.
- Keadrit, K., Rujjanawate, C., Amornlerdpison, D. (2010). Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of *Tacca chantrieri* Andre. *Journal of Medicinal Plants Research* **4**: 1991-1995.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1988). Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Journal of Biochemistry* **252**: 529-536.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1994). Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. *Methods in Enzymology* **233**: 502-512.
- Kettle, A.J., Robertson, I.G.G., Palmer, B.D., Anderson, R.F., Patel, K.B., Winterbourn, C.C. (1992). Oxidative metabolism of Amsacrine by the neutrophil enzyme myeloperoxidase. *Biochemical Pharmacology* **44**: 1731-1738.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1991). Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology* **41**: 1485-1492.
- Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. (1997). Myeloperoxidase: A Key Regulator of Neutrophil Oxidant Production. *Redox Reports* **3**: 3-15.
- Khong, P.W., Lewis, K.G. (1975). New triterpenoid extractives from *Lemaireocereus chichipe*. *Australian Journal of Chemistry* **28**: 165-172.



- Kinoshita, K., Akiba, M., Saitoh, M., Ye, Y., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., Yuasa, H. (1998). Antinociceptive Effect of Triterpenes from Cacti. *Pharmaceutical Biology* **36**: 50-55.
- Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., Yuasa, H. (2000). A New Triterpenoid Saponin from *Isolatocereus dumortieri*. *Journal of Natural Products* **63**, 701-703.
- Kircher, W.H. (1980). Triterpenes in organ pipe cactus. *Phytochemistry* **19**: 2707-2712.
- Kircher, W.H. (1977). Triterpene glycosides and queretaroic acid in organ pipe cactus. *Phytochemistry* **16**: 1078-1080.
- Kircher, W.H., Bird, H.L. (1982). Five 3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -dihydroxysterols in organ pipe cactus. *Phytochemistry* **21**: 1705-1710.
- Klebanoff, S.J. (2005). *Myeloperoxidase: friend and foe* *Journal of Leukocyte Biology* **77**: 598-625.
- Knight, J.C., Pettit, G.R. (1969). Arizona Flora: The sterols of *Peniocereus greggii*. *Phytochemistry* **8**: 477-482.
- Knight, J.C., Wilkinson, D.I., Djerassi, C. (1966). The structure of the Cactus Sterol Macdougallin (14 $\alpha$ -Methyl- $\Delta$ 8-cholestene-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol). A Novel Link in Sterol Biogenesis. *Journal of the American Chemical Society* **88**: 790-798.
- Koike, K. (2005). Molecular basis of hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis: lessons from animal model studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **10**: 132-135.
- Koschutnig, K., Heikkinen, S., Kemmob, S., Lampi, A.-M., Piironen, V., Wagner, K.H. (2009), Cytotoxic and apoptotic effects of single and mixed oxides of  $\beta$ -sitosterol on HepG2-cells. *Toxicology in Vitro* **23**: 755-762.
- Koyama, K., Yama, T., Kinoshita, K., Takahashi, K., Kondo, N., Yuasa H. (1993). New triterpenes from cactaceous plants. *Journal of Natural Products* **56**: 2201-2203.
- Kujubu, D.A., Herschman, H.R. (1992). Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 7991-7994.

- Kundu, J.K., Surh, Y.J., (2008), Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation Research* **659**: 15-30.
- Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., Stallings, W.C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**: 644-648.
- Kushner, I., Rzewnicki, D. (1999). Acute Phase Response. En: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Gallin, J.I., Snyderman, R. (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins.
- Landino, L.M., Crews, B.C., Timmons, M.D., Morrow, J.D., Marnett, L.J. (1996). Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 15069-15074.
- Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D. (1995). Prostaglandin synthase-1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* **83**, 483-492.
- Laszczyk, M.N. (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Medica* **75**: 1549-1560.
- Lau, D., Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* **111**: 16-26.
- Laye J.P., Gill, J.H. Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention? (2003). *Drug Discovery Today* **8**: 710-716.
- Lee, S.H., Soyoola, E., Chanmugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D., Hwang, D. (1992). Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 25934-25938.
- Lefkowitz, D.L., Gelderman, M.P., Fuhrmann, S.R., Graham, S., Starnes, J.D., Lefkowitz, S.S., Bollen, A., Moguilevsky, N. (1999). Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage

- interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. *Clinical Immunology* **91**: 145-55.
- Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 92-94.
- Livrea, M.A., Tesoriere, L. (2006). Health Benefits and Bioactive Components of the Fruits from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **8**: 73-90.
- Loll, P.J., Picot, D., Garavito, R.M. (1995). The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H<sub>2</sub> synthase. *Nature Structural Biology* **2**: 637-643.
- Lordana, S., Mackrillb, J.J., O'Brien, N.M. (2009), Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* **20**: 321-336.
- Luna-Moralez, C.C., Aguirre, R.R. (2001). Clasificación Tradicional, Aprovechamiento y Distribución Ecológica de la Pitaya Mixteca en México. *Interciencia* **26**: 18-24.
- Lusby, W.R., Buchmann, S.L., Feldlaufer, M.F. (1993). Pollen sterols from three species of Sonoran cacti. *Lipids* **28**: 469-470.
- Mandujano, M.C., Golubov J., Reyes J. (2002). Lo que usted siempre quiso saber sobre las cactáceas y nunca se atrevió a preguntar. *Biodiversitas* **40**: 4-7.
- Manning, C.B., Vallyathan, V., Mossman, B.T. (2002). Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *International Immunopharmacology* **2**: 191-200.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444.
- Mardini, I.A., FitzGerald, G.A. (2001). Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2 A Growing Class of Anti-Inflammatory Drugs. *Molecular Interventions* **1**: 30-38.
- Martín, R., Ibeas, E., Carvalho-Tavares, J., Hernández, Mm., Ruiz-Gutierrez, V., Nieto, M.L. (2009). Natural Triterpenic Diols Promote Apoptosis in Astrocytoma Cells through ROS-Mediated Mitochondrial Depolarization and JNK Activation. *PLoS ONE* **4**: e5975. doi:10.1371/journal.pone.0005975

- Marx, M., Leclercq, J., Tursch, B., Djerassi, C. (1967). Terpenoids. LX. Revised structures of the cactus triterpene lactones stellatogenin and thurberogenin. *Journal of Organic Chemistry* **32**: 3150-3154.
- Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C., Seibert, K. (1994). Selective Inhibition of Inducible Cyclooxygenase-2 in Inflammation and Pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 3228-3232.
- Material Safety Data Sheet, (2011). Indomethacin. Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2145 Delaware Avenue, Santa Cruz, California 95060. 4 p.
- Malle, E., Waeg, G., Schreiber, R., Grone, E. F., Sattler, W., Grone, H. J. (2000). Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *European Journal of Biochemistry* **267**: 4495-4503.
- McAdam, B.F., Mardini, I.A., Habib, A., Burke, A., Lawson, J.A., Kapoor, S., FitzGerald, G.A. (2000). Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *Journal of Clinical Investigation* **105**: 1473-1482.
- McCulloch, C.A., Downey, G.P., El-Gabalawy, H. (2006). Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Drug Discovery* **5**: 864-876.
- Medeiros, R., Otuki, M.F., Avellar, M.C., Calixto, J.B. (2007). Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene  $\alpha$ -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology* **559**: 227-235.
- Moussa-Ayoub, T.E., El-Samahy, S.K., Kroh, L.W., Rohn, S. (2011). Identification and Quantification of Flavonol Aglycons in Cactus Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Using a Commercial Pectinase and Cellulase Preparation. *Food Chemistry* **124**: 1177-1184.

- Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S., Salvemini, D. (2005). Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. *Pharmacological Reviews* **57**: 217-252.
- Monks, A., Scudeiro, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., *et al.* (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **83**: 757.
- Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin C.D., Tiano, H.F., Vouloumanos N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A. (1995). Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* **83**: 473-482.
- Morishita, Y., Morishima, Y., Ogura, M., Nagai, Y., Ohno, P. (1986). Biochemical characterization of human myeloperoxidase using three specific monoclonal antibodies. *British Journal of Haematology* **63**: 435-444.
- Morris, C.J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology* **225**: 115-121.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* **65**: 55-63.
- Mosshammer, M.R., C. Stintzing, F.C., Carle, R. (2006). Cactus Pear Fruits (*Opuntia spp.*): A Review of Processing Technologies and Current Uses. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **8**: 1-25.
- Muller, W.A. (2002). Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Laboratory Investigation* **82**: 521-533.
- Murakawa, M., Kumiko, Y., Yoshitana, T., Yoshiaki, F. (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochemical Pharmacology* **71**: 1331-1336.
- Nakamura, Y., Kozuka, M., Naniwa, K., Takabayashi, S., Torikai, K., Hayashi, R., Sato, T., Ohigashi, H., Osawa, T. (2003). Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Radical Biology & Medicine* **35**: 997-1007.

- Nakano, M., Denda, N., Matsumoto, M., Kawamura, M., Kawakubo, Y., Hatanaka, K., Hiramoto, Y., Sato, Y., Noshiro, M., Harada Y., (2007). Interaction between cyclooxygenase (COX)-1- and COX-2-products modulates COX-2 expression in the late phase of acute inflammation. *European Journal of Pharmacology* **559**: 210-218.
- Nam, K.Y., Morino, A., Kimura, S., Fujiki, H., Himanishi, Y. (1990). Modulation of phospholipase A2 activity by the tumour promoters phorbol esters and teleocidin. *Biochemical Journal* **268**: 169-173.
- Nantel, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K.M., Chan, C.C. (1999). Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology* **128**: 853-859.
- Nauseef, W.M. (1986). Myeloperoxidase biosynthesis by a human promyelocytic leukemia cell line: insight into myeloperoxidase deficiency. *Blood* **67**: 865-872.
- Nauseef, W.M., Olsson, I., Arnljots, K. (1988). Biosynthesis and processing of myeloperoxidase--a marker for myeloid cell differentiation. *European Journal of Haematology* **40**: 97-110.
- Nauseef, W.N. (2001). Contributions of Myeloperoxidase to Proinflammatory Events: More Than an Antimicrobial System. *International Journal of Hematology* **74**: 125-133.
- Nes, W.D., Schmidt, J.O. (1988). Isolation of 25(27)-dehydrolanost-8-enol from *Cereus giganteus* and its biosynthetic implications. *Phytochemistry* **27**: 1705-1708.
- Nicholls, S.J., Hazen, S.L. (2009). Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *Journal of Lipid Research* **50**: S346-S351.
- Nieto-Mendoza, E., Guevara-Salazar, J.A., Ramírez-Apan, M.T., Frontana-Uribe, B.A., Cogordan, J.A., Cárdenas, J. (2005). Electro-Oxidation of Hispanolone and Anti-Inflammatory Properties of the Obtained Derivatives. *Journal of Organic Chemistry* **70**: 4538-4541.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-Ecol-1994Diario Oficial de la Federación, 1994. Tomo CDLXXXVIII, núm. 10, México.

- O'Banion, M.K., Winn V.D., Young D.A. (1992). cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**: 4888-4892.
- Ocegueda S., Llorente-Bousquets, J. (2008). Catálogo taxonómico de especies de México, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México, CD1.
- Ogunbodede, O., McCombs, D., Trout, K., Daley, P., Terry, M. (2010). New mescaline concentrations from 14 taxa/cultivars of *Echinopsis spp.* (Cactaceae) ("San Pedro") and their relevance to shamanic practice. *Journal of Ethnopharmacology* **131**: 356-62.
- Okazaki, S., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Yuasa, H. (2007). New triterpene saponins from *Stenocereus eruca* (Cactaceae). *Journal of Natural Medicines* **61**: 24-29.
- Ortiz de Montellano, P.R. (1992). Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **32**: 89-107.
- Ovesná, Z., Vachálková, A., Horváthová, K., Tóthová, D. (2004). Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma* **51**: 327-333.
- Oviedo-Chavez, I., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M. (2005), Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **57**: 1087-1092.
- Oviedo-Chavez, I., Ramirez-Apan, T., Soto-Hernandez, M., Martinez-Vazquez, M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* **11**, 436-445.
- Panasenko, O.M, Evgina, S.A., Aidyraliev, R.K., Sergienko, V.I., Vladimirov, Y.A. (1994). Peroxidation of human blood lipoproteins induced by exogenous hypochlorite or hypochlorite generated in the system of "myeloperoxidase + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Cl<sup>-</sup>". *Free radical biology & medicine* **16**: 143-148.
- Panigrahy, D., Kaipainen, A., Greene, E.R., Huang, S. (2010). Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Review* **29**:723–735.

- Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Phankummoon, A., Panthong, K., Reutrakul, V. (2004). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmandiana* Pierre. *Journal of Ethnopharmacology* **91**: 237-242.
- Peredes, F.M., Lira, S.R., Dávila, A.P. (2007). Estudio Etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Acta Botánica Mexicana* **79**: 13-61.
- Patrick, E., Maibach, H.I., Burkhalter, A. (1985). Mechanism of chemically induced skin irritation. *Toxicology and Applied Pharmacology* **81**: 476-490.
- Petronelli, A., Pannitteri, G., Testa, U. (2009). Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-cancer Drugs* **20**: 880-892.
- Piga, A. (2004). Cactus Pear: A Fruit of Nutraceutical and Functional Importance. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **6**: 9-22.
- Porta, C., Larghi, P., Rimoldi, M., Totaro, M.G., Allavena, P., Mantovani, A., Sica, A. (2009). Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology* **214**: 761-777.
- Puigneró, V., Turull, A., Queralt, J. (1998). Arachidonic acid (aa) and Tetradecanoylphorbol acetate (tpa) exert systemic effects when Applied topically in the mouse. *Inflammation* **22**: 307-314.
- Puigneró, V., Queralt, J. (1997). Effect of Topically Applied Cyclosporin A on Arachidonic Acid (Aa)- and Tetradecanoylphorbol Acetate (Tpa)-Induced Dermal Inflammation in Mouse Ear. *Inflammation* **21**: 357-369.
- von Rahden, B.H., Stein, H.J., Puhlinger, F., Koch, I., Langer, R., Piontek, G., Siewert, J.R., Höfler, H., Sarbia, M. (2005). Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Research* **65**: 5038-5044.
- Recio, M.C., Giner, R.M., Mánez, S., Gueho, J., Julien, H.R., Hostettmann, K., Ríos, J.L. (1995a). Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Medica* **61**: 9-12.
- Recio, M.C., Giner, R.M., Mánez, S., Ríos, J.L. (1995b). Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Medica* **61**: 182-185.



- Reyes, S.J. (2009). Conservación y restauración de cactáceas y otras plantas suculentas mexicanas. Manual Práctico. CONAFOR y SEMARNAT, México. 108 p.
- Reyes, J., Terrazas, T. (1991). Cactáceas raras, amenazadas y en peligro de extinción de las colecciones del Jardín Botánico, IB-UNAM. *Amaranto* **4**: 7-10. (Citado en Mandujano *et al.*, 2002).
- Rhodes, P., Leone, A.M., Francis, P.L., Struthers, A.D., Moncada, S., Rhodes, P.M. (1995). The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **209**: 590-596.
- Richardson, M. (1978) Flavonols and C-Glycosylflavonoids of the Caryophyllales. *Biochemical Systematics and Ecology* **6**: 283-286.
- Ríos, J.L. (2010). Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology* **128**: 1-14.
- Roder, D.M. (2002). The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* **5**: 5-11.
- Rosenberg H.F., Gallin J.I. (2003), Inflammation. In: Paul W. (Editor), *Fundamental Immunology*. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins.
- Rowlands, D.K., Kao, C., Wise, H. (2001). Regulation of prostacyclin and prostaglandin E(2) receptor mediated responses in adult rat dorsal root ganglion cells, in vitro. *British Journal of Pharmacology* **133**: 13-22.
- Rowlinson, S.W., Crews, B.C., Lanzo, C.A., Marnett, L.J. (1999). The binding of arachidonic acid in the cyclooxygenase active site of mouse prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). A putative L-shaped binding conformation utilizing the top channel region. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 23305-23310.
- Salazar, J.R., Martínez-Vazquez, M., Cespedes, C.L., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., Rodríguez-Silverio, J., Flores-Murrieta, F. (2011). Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Chichipegenin, Peniocerol, and Macdougallin Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con. *Zeitschrift für Naturforschung* **66c**: 24-30.
- Salt, T.A., Tocker, J.E. and Adler, J.H. (1987). Dominance of 5-sterols in eight species of the Cactaceae. *Phytochemistry* **29**: 731-733.

- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Wyatt, P.A., Bourdon, D.M., Marino, M.H., Manning, P.T., Currie, M.G. (1996). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology* **118**: 829-838.
- Sánchez, T., Moreno, J.J. (1999a). Role of prostaglandin-H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol Ester application on skin. *Prostaglandins and other Lipid Mediators* **57**: 119-131.
- Sánchez, T., Moreno, J.J. (1999b). Role of leucocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochemical Pharmacology* **58**: 877-879.
- Sánchez-González, A., Granados-Sánchez, D., Simón-Nabor, R. (2008). Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura* **14**: 271-279.
- Sandoval, A., Manjarrez, A., Leeming, P.R., Thomas, G.H., Djerassi, C. (1957). Terpenoids. XXX. The structure of the cactus triterpene chichipegenin. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 4468-4472.
- Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* **42**: 163-175.
- Schlingemann, J., Hess, J., Wrobel, G., Breitenbach, U., Gebhardt, C., Steinlein, P., Kramer, H., Fürstenberger, G., Hahn, M., Angel, P., Lichter, P. (2003). Profile of gene expression induced by the tumour promoter TPA in murine epithelial cells. *International Journal of Cancer* **104**: 699-708.
- Schmidt, H.H.H.W., Nau, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K.E., Klein, M.M. (1988) Arginine is the physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *European Journal of Pharmacology* **154**: 213-216.
- Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Graber, P., Coulter, S., Libby, P. (1999). Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology* **155**, 1281-1291.

- Schwartzburd, P.M. (2003). Chronic inflammation as inductor of pro-cancer microenvironment: Pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer and Metastasis Reviews* **22**: 95-102.
- Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., Kunert, O. (2003). Complete assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry* **41**: 636–638.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 12013-12017.
- Shacter, E., Lopez, R.L., Patia, S. (1991). Inhibition of the myeloperoxidase- $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$  system of neutrophils by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology* **41**: 975-984.
- Shamma, M., Rosenstock, P D. (1959). Triterpenes of *Heliabravoa chende*. *Journal of Organic Chemistry* **24**: 726-728.
- Shedbalkar, U.U., Adki, V.S., Jadhav, J.P., Bapat, V.A. (2010). *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. *Tropical Plant Biology* **3**: 136-150.
- Sheng, H., Shao, J., Dixon, D.A., Williams, C.S., Prescott, S.M., DuBois, R.N., Beauchamp, R.D. (2000). Transforming growth factor-beta1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 6628-6635.
- Simmons, D.L., Botting, R.M. Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews* **56**: 387–437
- Six, D.A., Dennis, E.A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* **1488**: 1-19.
- Smith, C.J., Zhang, Y., Koboldt, C.M., Muhammad, J., Zweifel, B.S., Shaffer, A., Talley, J.J., Masferrer, J.L., Seibert, K., Isakson, P.C. (1998). Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**: 13313-13318.

- Sogno, I., Vannini, N., Lorusso, G., Cammarota, R., Noonan, D.M., Generoso, L., Sporn, M.B., Albini, A. (2009). Anti-angiogenic activity of a novel class of chemopreventive compounds: oleanic acid terpenoids. *Recent Results in Cancer Research* **181**: 209-212.
- de Souza-Pereira R. (2009), Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors used for preventing or regressing cancer. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **4**: 157-163.
- Standifer, L.N., Barbier, M.D. (1968). Pollen sterols - a mass spectrographic survey. *Phytochemistry* **7**: 1361-1365.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia spp.*): a review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**: 175-194.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. (2002). Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry* **77**: 101-106.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* **62**: 247-269.
- Stock, J.L., Shinjo, K., Burkhardt, J., Roach, M., Taniguchi, K., Ishikawa, T., Kim, H.S., Flannery, P.J., Coffman, T.M., McNeish, J.D., Audoly, L.P. (2000). The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *Journal of Clinical Investigation* **107**: 325-331.
- Sultana, N., Ata, A. (2008). Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **23**: 739-756.
- Sun, H., Fang, W.S., Wang, W.Z., Hu, C. (2006). Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. *Botanical Studies* **47**: 339-368.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T. (1983). Assay method for mieloperoxidase in human polymorfonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry* **132**: 345-352.
- Svensson. B.E. (1988). Myeloperoxidase oxidation states involved in myeloperoxidase-oxidase oxidation of thiols. *Journal of Biochemistry* **256**: 751-755.

- Svensson, C.I., Yaksh, T.L. (2002). The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**: 553-583.
- Taddei-Bringas, G.A., Santillana-Macedo, M.A., Romero-Cancio, J.A., Romero-Téllez, M.B. (1999). Acceptance and use of medicinal plants in family medicine. *Salud Pública de México* **41**: 216-220.
- Takizawa, T., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N., Yuasa H. (1995). A new triterpene from *Rathbunia alamosensis*. *Journal of Natural Products* **58**: 1913-1914.
- Taylor, K.R., Gallo, R.L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB Journal* **20**: 9-22.
- Thun, J.M., Henley, S.J., Patrono, C. (2002). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues. *Journal of the National Cancer Institute* **94**: 252-266.
- Titos, E. (2004). Biosíntesis de mediadores lipídicos derivados de la 5-lipooxigenasa en el sinusoide hepático. Implicaciones en la fibrogénesis hepática. (Disertación Doctoral, Universitat de Barcelona, España).
- Turini, M.E., DuBois, R.N. (2002). Cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. *Annual Reviews in Medicine* **53**: 35-57.
- Trush, M.A., Egner, P.A., Kensler, T.W. (1994). Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food and Chemical Toxicology* **32**:143-147.
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., Takido, M. (2001). Constituents of Compositae Plants. 2. Triterpene Diols, Triols, and Their 3-O-Fatty Acid Esters from Edible *Chrysanthemum* Flower Extract and Their Anti-inflammatory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 3187-3197.
- Valente, L.M.M, da Paixão, D., do Nascimento, A.C., dos Santos, P.F.P., Scheinvar, L.A., Moura, M.R.L., Tinoco, L.W., Nelson, L., da Silva, J.F.M. (2010). Antiradical

- Activity, Nutritional Potential and Flavonoids of the Cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). *Food Chemistry* **123**: 1127-1131.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* **38**: 97-120.
- Vanegas, H., Schaible, H.G. (2001). Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. *Progress in Neurobiology* **64**: 327-363.
- Wang, X., Lin, Y. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacologica Sinica* **29**: 1275-1288.
- Weiss, S. J., Klein, R., Slivka, A., Wei, M. (1982) Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *Journal of Clinical Investigation* **70**: 598-607.
- Werz, O., Klemm, J., Samuelsson, B., Radmark, O. (2001). Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **97**: 2487-2495.
- Weisinger, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology* **64**: 365-91.
- Wink, D.A., Ridnour, L.A., Hussain, S.P., Harris, C.C. (2008). The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric Oxide* **19**: 65-67.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. (1962). Carrageenin - induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **111**: 544-547.
- Wollenweber, E., Doerr, M. (1995). Wax composition of the two cacti *Hylocereus purpusii* and *Stenocereus beneckii*. *Biochemical Systematics and Ecology* **23**: 577.
- Wybraniec, S., Platzner, I., Geresh, S., Gottlieb, H.E., Haimberg, M., Mogilnitzki, M., Mizrahi, Y. (2001). Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. *Phytochemistry* **58**: 1209-1212.
- Wymann, M.P., Schreiner, R. (2008). Lipid signalling in disease. *Molecular Cell Biology* **9**: 162-176.
- Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L., Simmons, D.L. (1991). Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is

- regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**: 2692-2696.
- Yaksh, T.L., Dirig, D.M., Conway, C.M., Svensson, C., Luo, Z.D., Isakson, P.C. (2001). The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *Journal of Neurosciences* **21**: 5847-5853.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kasahara, Y., Kimura, Y., Yamanouchi, S., Kumaki, K., Tamura, T., Takido, M. (1996). Inhibitory effect of Di- and Trihydroxy Triterpenes from the Flowers of Compositae on 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced Inflammation in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **19**: 1329-1331.
- Ye, W., Liu, X., Zhang, Q., Che, C., Zhao, S. (2001). Antisweet Saponins from *Gymnema sylvestre*. *Journal of Natural Products* **64**: 232-235.
- Ye, Y., Kaoru Kinoshita, K., Kiyotaka Koyama, K., Kunio Takahashi, K., Norio Kondo, N., Yuasa, H. (1998). New Triterpenes from *Machaerocereus eruca*. *Journal of Natural Products* **61**: 456-460.
- Yedgar, S., Cohen, Y., Shoseyov, D. (2006). Control of Phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1761**: 1373-1382.
- Yoshikawa, K., Ogata, H., Arihara, S., Chang, H., Wang, J. (1998). Antisweet Natural Products. XIII. Structures of Alternosides I-X from *Gymnema alternifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **46**: 1102-1107.
- Yoshimura, A. (2006). Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Science* **97**: 439-447.
- Youa, H.J., Choib, C.Y., Kimb, J.Y., Parkc, S.J., Hahmc, K.S., Jeong, H.G. (2001). Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production via nuclear factor- $\kappa$ B activation in the resting macrophages. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **509**: 156-160.
- Zhang, C., Yang, J., Jacobs, J. D., Jennings, L. K. (2003). Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature:

implications for vascular diseases. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **285**: H2563–H2572.

Zhang, Y., Shaffer, A., Portanova, J., Seibert, K., Isakson, P.C. (1997). Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E<sub>2</sub> production. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **282**: 1069-1075.

Zhao, W., Tilton, R.G., Corbett, J.A., McDaniel, M.L., Misko, T.P., Williamson, J.R., Cross, A.H., Hickey, W.F. (1996). Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. *Journal of Neuroimmunology* **64**: 123-133.



## **XI. Anexos**

### **ANEXO 1. ARTÍCULO PUBLICADO**

## Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Chichipegenin, Peniocerol, and Macdougallin Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con.

Juan Rodrigo Salazar<sup>1\*</sup>, Mariano Martínez-Vázquez<sup>1,2</sup>, Carlos L. Cespedes<sup>3</sup>, Teresa Ramírez-Aparó<sup>4</sup>, Antonio Nieto-Camacho<sup>4</sup>, Juan Rodríguez-Silverio<sup>5,6</sup>, and Francisco Flores-Murrieta<sup>6,4</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Carrizal Exterior, Coyoacán, C. P. 04510, México, D. F., México. Fax: 55162202. E-mail: marvaz@servidor.unam.mx

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad del Bío-Bío, Chillán, Chile

<sup>3</sup> Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, D. F., México

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México, D. F., México

<sup>5</sup> Current address: Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad del Valle de México, Campus Tlapan, Ciudad de México, México

<sup>6</sup> Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. 66c, 24–30 (2011); received April 9/September 4, 2010

The oleanane type triterpene chichipegenin and the sterols peniocerol and macdougallin, isolated from *Myrtillocactus geometrizans*, showed anti-inflammatory activities in both the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse ear edema model and the carrageenan-induced rat paw edema model. All tested compounds inhibited the TPA-induced edema in a dose-dependent manner, with ED<sub>50</sub> values less than or equal to that shown by indometacin. Among them, peniocerol was the most active compound. However, only peniocerol and macdougallin reduced carrageenan-induced rat paw edema. On the other hand, peniocerol and macdougallin showed cytotoxicity against several human cancer cell lines. These results indicate that compounds isolated from *M. geometrizans* possess anti-inflammatory and cytotoxic properties, and the presence of chichipegenin in the aerial parts could justify the medicinal uses attributed to the plant.

**Key words:** *Myrtillocactus geometrizans*, Anti-Inflammatory, Cytotoxicity

### Introduction

Cancer has been associated with the inflammation process since 1863, when Rudolf Virchow discovered leukocytes in neoplastic tissue. Since then, there is increasing evidence that chronic inflammation in damaged tissues contributes as a significant risk factor to tumour promotion, progression, and metastasis (Mantovani *et al.*, 2008). Furthermore, in the microenvironments of various tumour types, elevated levels of pro-inflammatory cells have been found, and the transcription nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B), which is involved in the inflammatory process is expressed. Also, high levels of the pro-inflammatory enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) have been reported (Kundu and Surh, 2008).

Therefore, as an alternative to traditional treatments that are losing their effectiveness or are

nonspecific and highly toxic, some of the specific components of the chronic inflammatory response have recently become potential therapeutic targets for achieving chemoprevention of cancer or chemotherapy (Dokest *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2008; Wang and Lin, 2008; Wink *et al.*, 2008; de Souza Pereira, 2009).

Taking into account the above, our group has made considerable efforts to identify phytochemicals that show both anti-inflammatory activity as well as cytotoxic properties (Oviedo-Chavez *et al.*, 2004, 2005; Flores-Rosete and Martínez-Vázquez, 2005). Our results and those of other groups have shown that triterpenes and sterols are promising groups of natural compounds, not only for their anti-inflammatory properties but also for their cytotoxicity against several human cancer cell lines. These properties make these compounds attractive to develop new antitumour drugs (Akihisa and Yasukawa, 2001; Parra-Delgado *et al.*, 2006).

As part of our systematic search for bioactive secondary metabolites from plants, we decided to begin a series of phytochemical and biological studies using extracts and compounds isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Cnn. (Cactaceae), which is commonly known in Central Mexico as "garambello" and is used as anti-inflammatory remedy in the Mixteco (Oaxaca State) and Otomic (Hidalgo State) folk medicines (Tuna-Morales and Aguirre, 2001; Sanchez Gonzalez *et al.*, 2008).

In a previous work we reported the isolation of diichipegenin (1), peniocerol (2), and macdougalin (3) from this species (Céspedes *et al.*, 2005). Although these compounds have been isolated in previous studies from several species of the Cactaceae family (Sandoval *et al.*, 1957; Djerassi *et al.*, 1957, 1968; Knight *et al.*, 1966; Knight and Felt, 1959; Khong and Lewis, 1975; Kircher and Bird, 1932), their biological activities, which could explain the traditional use of *M. geometrizans*, have not been studied.

The aim of the present research was to evaluate the anti-inflammatory activity of compounds 1, 2, and 3 in both the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse ear edema model and the carrageenan induced rat paw edema test, as well as to assess their cytotoxic activities against a set of human cancer cell lines in the sulforhodamine B test.

## Material and Methods

### General experimental procedures

All solvents, sulforhodamine B (SRB), RPMI-1640 medium, dimethyl sulfoxide (DMSO), doxorubicin, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), indomethacin, Tween 80, carrageenan  $\lambda$  type IV, trichloroacetic acid, tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris), trypsin-EDTA, sodium pentobarbital, streptomycin, L-glutamine, and penicillin were from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Phosphate buffered-saline (PBS), Dulbecco's modified essential medium (DMEM), and fetal bovine serum were from GIBCO, Grand Island, NY, USA. Colon carcinoma (HCT-15), Ureas carcinoma (MCF-7), leukemia (K-562 CML), central nervous system (CNS) carcinoma (U 251 Gli), and prostate carcinoma (PC-3) cell lines were supplied by the National Cancer Institute, USA.

### Isolation

3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,22 $\alpha$ ,28-Tetrol-olean-12-ene (chichipegenin, 1), 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol-cholest-8-ene (peniocerol, 2), and 14 $\alpha$ -methyl-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diol-cholest-8-ene (macdougalin, 3) were isolated and purified as previously described (Céspedes *et al.*, 2005). Copies of the original spectra are obtainable from the author for correspondence.

### Animals

Male CD-1 mice, weighing 25–30 g, were provided from Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Male Wistar rats, weighing 150–210 g were provided from Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México, México. They were treated as approved by the Animal Care and Use Committee (PROY-NOM-087-ECOL-SSA1-2000). All animals were held under standard laboratory conditions in the animal house at (27  $\pm$  1) °C with a 12 h/12 h light-dark cycle and were fed with laboratory diet and water *ad libitum*. All experiments were carried out using a minimum of six animals per group.

### TPA-induced ear edema test

Evaluation of anti-inflammatory effects of compounds 1–3 was performed according to the TPA induced mouse ear edema test previously described (Oviado Chavez *et al.*, 2004). Briefly, groups of six male CD-1 mice were anesthetized with sodium pentobarbital [3.5 mg/kg, intraperitoneal (i.p.) injection], and a solution of 25  $\mu$ g TPA dissolved in 10  $\mu$ L of ethanol was topically applied to both sides of the right ear of the mice (5  $\mu$ L each side). The left ear received only ethanol (5  $\mu$ L each side). After 10 min of TPA treatment, compounds 1–3 were separately applied in a 0.01–0.47 mg/ear dose range, dissolved in ethanol. Indomethacin (4) as reference drug was applied in a 0.01–0.16 mg/ear dose range, dissolved in 1:1 ethanol/acetic. Control animals received only the respective solvent mixture. 4 h later the animals were sacrificed by cervical dislocation and a plug (7 mm in diameter) was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between right and left ear plugs. The percentage of edema inhibition (EI, %) was calculated by the equation: EI (%) = 100 [(B - 100)/A], where A is the edema induced by TPA alone, and B is the edema induced by TPA plus sample.

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM of six mice. The effective dose 50 (ED<sub>50</sub>) values were estimated from linear regression equations calculated with significant data.

#### *Carageenan-induced rat paw edema test*

The carageenan-induced rat paw edema was performed according to the method described previously (Oviedo-Chavez *et al.*, 2004), with slight modifications. Briefly, the basal volume of the right paw of each rat was measured with a plethysmometer (model 7150, UGO, Basile, Varese, Italy). Immediately thereafter, compounds 1–3 were administered i.p. in a solvent mixture of Tween 80 (5%) in water and DMSO (v/v), at doses of 45, 50, and 100 mg/kg body weight. Indomethacin (4) was administered at doses of 2.5, 5, 7.5, and 10 mg/kg i.p. in the same solvent mixture. The control group received i.p. only the solvent mixture. 1 h later, paw edema was induced by subplantar injection of 0.1 mL of carageenan  $\lambda$  (0.1% in saline) into the plantar surface of the right hind paw of all animals. The paw volume was measured 1, 2, 3, 4, and 5 h after the carageenan injection. The anti-inflammatory activity was measured as the area under the curve (AUC). Total inhibition (TI, %) was obtained for each group and at each record using the following rank: TI (%) = [AUCcontrol – AUCtreat] · 100/AUCcontrol, where AUCcontrol is the area under the curve of the control group, and AUCtreat is the area under the curve of the treated group. Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM.

#### *Sulforhodamine B (SRB) cytotoxicity assay*

The cytotoxic effects of compounds 1–3 were determined following protocols previously described (Oviedo-Chavez *et al.*, 2005). The human prostate carcinoma (PC-3), leukemia (K-562), central nervous system carcinoma (U-251), breast carcinoma (MCF-7), and colon carcinoma (HCT-15) cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and 1% nonessential amino acids. They were maintained at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with 95% humidity. Adherent cells were detached with 0.1% trypsin EDTA to make single-cell suspensions. Viable cells were counted using a hemacytometer. Cells (5000–10000 cells/well) were seeded in 96 well microtiter

plates and incubated at 37 °C. After 24 h, cells were treated with seven different concentrations (1–50  $\mu$ M) of the test compounds initially dissolved in DMSO (20 mM) and further diluted in medium to produce the desired concentrations. The plates were incubated for another 48 h at 37 °C. Doxorubicin was used at five different concentrations (0.01–5  $\mu$ M) as a positive control. After 48 h, adherent cell cultures were fixed *in situ* by adding 50  $\mu$ L of cold 50% (v/v) trichloroacetic acid, and the mixture was incubated for 30 min at room temperature with 0.4% SRB. Unbound SRB solution was removed washing three times with 1% acetic acid. Plates were air-dried, protein-bound SRB was dissolved with Tris buffer, and optical densities were read on an automated spectrophotometric plate reader at a wavelength of 515 nm. The concentrations required to inhibit cell growth by 50% (IC<sub>50</sub>) were calculated.

#### *Statistics*

The one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test were used to compare several groups with the respective control. Values of \* $p$  < 0.05 or \*\* $p$  < 0.01 were considered significant.

#### *Results*

The triterpene chichipegenin (1) together with the sterols periconorol (2) and macrocyclic (3) (Fig. 1) were tested for their anti-inflammatory activities using the TPA-induced ear edema in mice and carageenan-induced rat paw edema model, as well as for their *in vitro* cytotoxic properties.

#### *TPA-induced ear edema test*

All tested compounds showed anti-inflammatory activity in a dose-dependent manner, with

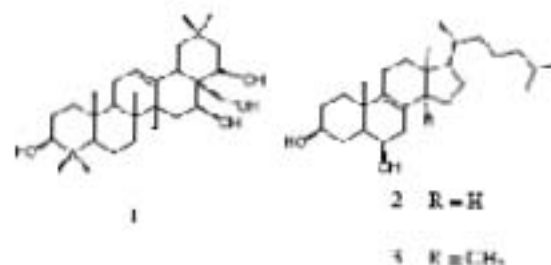


Fig. 1. Chemical structures of chichipegenin (1), periconorol (2), and macrocyclic (3) isolated from *Myrtillocactus geometrizans*.

Table I. Effect of topical administration of chichipegerin (1), penicoerol (2), macedougollin (3), and indomethacin (4) on TPA-induced ear edema. The data represents the mean of 5 animals  $\pm$  standard mean error (mean  $\pm$  SME). All data were analysed by ANOVA followed by Dunnett's test, and the values of \*  $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  are considered as statistically different with respect to the control.

Compound	Dose [ $\mu$ mol/ear]	Edema [ $\mu$ g]	Inhibition (%)	ED <sub>50</sub> [ $\mu$ mol/ear]
1	0	12.55 $\pm$ 0.38	-	0.172 $r = 0.99$
	0.021	11.57 $\pm$ 0.35	7.77	
	0.1	7.60 $\pm$ 1.96 **	39.44	
	0.21	4.70 $\pm$ 0.60 **	62.55	
	1	2.57 $\pm$ 0.41 **	79.48	
2	0	14.46 $\pm$ 0.70	-	0.091 $r = 0.95$
	0.021	10.22 $\pm$ 0.79 *	28.20	
	0.1	5.88 $\pm$ 1.18 **	58.71	
	0.21	4.66 $\pm$ 1.44 **	67.25	
	1	4.35 $\pm$ 0.53 **	69.45	
3	0	15.21 $\pm$ 0.78	-	0.27 $r = 0.97$
	0.1	11.83 $\pm$ 1.34	15.75	
	0.18	10.65 $\pm$ 1.00 **	35.71	
	0.21	5.38 $\pm$ 1.25 **	62.13	
	1	2.63 $\pm$ 0.71 **	81.5	
4	0	16.24 $\pm$ 0.86	-	0.272 $r = 0.97$
	0.12	10.53 $\pm$ 1.04 **	35.15	
	0.24	8.18 $\pm$ 0.34 **	48.18	
	0.45	7.16 $\pm$ 1.34 **	55.79	
	0.72	4.97 $\pm$ 1.70 **	69.42	
	1.2	1.57 $\pm$ 0.33 **	89.19	

ED<sub>50</sub> values between 0.09 and 0.27  $\mu$ mol/ear. The results are summarized in Table I. All compounds showed activity comparable to indomethacin (ED<sub>50</sub> = 0.272  $\mu$ mol/ear). Among them, steroid 2 had a strong inhibitory effect (ED<sub>50</sub> = 0.091  $\mu$ mol/ear), while the tripeptide 1 (ED<sub>50</sub> = 0.172  $\mu$ mol/ear) and compound 3 (ED<sub>50</sub> = 0.27  $\mu$ mol/ear) had almost the same order of potency as indomethacin.

#### Carrageenan-induced rat paw edema test

Compounds 1, 2, and 3 were evaluated in the carrageenan-induced rat paw edema test, and indomethacin was included as a reference drug. The *in vivo* data are summarized in Table II. Subplantar injection of carrageenan induced edema which reached a maximum 4 h after administration. The value of the area under the curve (AUC) was used to quantify the temporal evolution of the inflammation produced by carrageenan, and low AUC values indicated anti-inflammatory activity.

Both compounds 2 and 3, in doses of 45, 60, and 100 mg/kg i.p., showed significant dose-dependent inhibition of the AUC with ED<sub>50</sub> values of 31.88 mg/kg and 53.25 mg/kg, respectively. Al-

though compound 1 also showed anti-inflammatory activity, its effect did not reach 50% inhibition, even at a dose of 100 mg/kg.

Unlike in the TPA test, indomethacin (ED<sub>50</sub> = 6.65 mg/kg) was more potent than compounds 1–3. However, compounds 2 and 3 at a dose of 100 mg/kg showed inhibition of the AUC equivalent to that produced by indomethacin at 10 mg/kg.

#### Sulforhodamine B (SRB) cytotoxicity assay

The cytotoxic activity of compounds 1, 2, 3, and doxorubicin was evaluated against central nervous system carcinoma (C-251), prostate carcinoma (PC-2), leukemia (K-562), colon carcinoma (HCT 15), and breast cancer (MCF 7) human cell lines. The values of 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) are shown in Table III. Among the compounds, 1 did not inhibit the growth of cancer cells by more than 50% at a dose of 200  $\mu$ M. On the other hand, 2 and 3 showed moderate cytotoxicity against all cancer cell lines with IC<sub>50</sub> values of 7.50 to 24.73  $\mu$ M. 2 was more active against all the human cancer lines tested except against the K-562 line where 3 was more active. Never-

Table II. Effects of elichipegenin (1), penicoerol (2), macedougallin (3), and indomethacin (4) in the carrageenan induced rat paw edema model. The data represents the mean of  $n=4$  animals  $\pm$  standard mean error (mean  $\pm$  SEM). All data were analysed by ANOVA followed by Dunnett's test, and the values of \* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$  are considered as statistically different with respect to the control. ND, not determined.

Compound	Dose [ $\mu\text{g/kg}$ ]	Ecema [mL/h]					AUC	AUC inhibition (%)	ED <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/kg}$ ]
		1	2	3	4	5			
Control	-	0.42 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.04	2.65 $\pm$ 0.1	-	-
1	45	0.31 $\pm$ 0.10	0.68 $\pm$ 0.09	0.66 $\pm$ 0.04	0.67 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.08	2.44 $\pm$ 0.25*	33.15	ND
	100	0.34 $\pm$ 0.05	0.47 $\pm$ 0.1	0.66 $\pm$ 0.2	0.70 $\pm$ 0.2	0.74 $\pm$ 0.2	2.37 $\pm$ 0.20**	35.07	
2	30	0.20 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.06	1.98 $\pm$ 0.18**	45.75	31.88
	45	0.11 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.04	1.80 $\pm$ 0.07**	50.63	
	60	0.15 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.20**	73.13	
3	100	0.34 $\pm$ 0.07	0.77 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.03	1.85 $\pm$ 0.17**	75.71	33.25
	45	0.27 $\pm$ 0.06	0.61 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.07	2.35 $\pm$ 0.24*	35.62	
	60	0.33 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.06	0.25 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.12**	62.33	
4	100	0.28 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.09**	75.33	6.68
	2.5	0.36 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.05	2.24 $\pm$ 0.20*	11.23	
	50	0.28 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.07	0.79 $\pm$ 0.08	0.82 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.07	2.78 $\pm$ 0.25**	23.80	
	7.5	0.18 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.08	0.23 $\pm$ 0.09	0.33 $\pm$ 0.07	1.78 $\pm$ 0.26**	51.23	
	100	0.16 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.02**	77.67	

theless, the IC<sub>50</sub> values are an order of magnitude higher than those exhibited by doxorubicin.

## Discussion

Both TPA- and carrageenan-induced inflammation models have been frequently used to identify anti-inflammatory activity both of extracts of medicinal plants and of substances isolated from them.

Topical application of TPA induces a prolonged biphasic inflammatory response, with a first phase characterized by edema of the dermis and increased levels of TNF- $\alpha$ , followed by a secondary phase in which the enzyme COX-2 is induced, accompanied by the accumulation of pro-inflammatory cells and production of eicosanoids such as leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), among others (Sánchez and

Moreno, 1990; Murakawa *et al.*, 2006). Topical administration of compounds 1, 2, and 3 strongly inhibited TPA-induced edema in the same, or even higher, magnitude as the cyclooxygenase inhibitor indomethacin. Our results suggest that these compounds could interfere with the biosynthesis or activity of eicosanoids, since it has been demonstrated that 3 h after application of TPA, eicosanoids levels began to increase significantly in treated tissues and correlated with the magnitude of the inflammatory response (Murakawa *et al.*, 2006).

On the other hand, the subplantar injection of carrageenan induced an acute rat paw edema, which develops in three phases: an initial phase mediated by both histamine and 5-hydroxytryptamine, followed by a second kinin-mediated phase, notably the endogenous nonapeptide bradykinin produced by kallikrein (Di Rosa,

Table III. IC<sub>50</sub> values ( $\mu\text{M}$ ) of elichipegenin (1), penicoerol (2), macedougallin (3), and doxorubicin (DOX) on human cancer cell lines. The data represents the mean  $\pm$  standard mean error (mean  $\pm$  SEM) of three independent experiments. The IC<sub>50</sub> values were obtained by interpolation of plots (activity vs. log [ $\mu\text{M}$ ]) from statistically significant data. ND, not determined.

Compound	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]				
	U-251	TC-3	K-562	HCT-15	MCF-7
1	>200	>200	>200	>200	>200
2	24.73 $\pm$ 3.9	19.35 $\pm$ 3.45	10.37 $\pm$ 0.73	10.87 $\pm$ 2.36	13.17 $\pm$ 0.79
3	ND	20.78 $\pm$ 3.79	7.50 $\pm$ 0.1	17.30 $\pm$ 0.25	23.23 $\pm$ 0.17
DOX	0.09 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.01



1977), and a final phase attributed to local production of prostaglandins (PG), whose synthesis is mediated mainly by COX-2 (Seibert et al., 1994).

Although 2 and 3 at a dose of 100 mg/kg body weight significantly inhibited rat paw edema in all phases, suggesting a nonselective inhibitory effect against the mediators implied in carrageenan-induced edema, their anti-inflammatory effects were significantly more pronounced and prolonged against the third phase of the inflammation model, in which eicosanoids are implicated. Our results suggest that the anti-inflammatory effects observed with both compounds 2 and 3 are due to interference with eicosanoid mediators. But additional experiments are necessary to support this proposal.

On the other hand, only sterols 2 and 3 showed moderate cytotoxic activities against human cancer cell lines. Both compounds have the same  $3\beta,6\alpha$ -diol-cholest-8-one core and are similar to oxysterols. Oxidized derivatives of cholesterol and phytosterols (especially diols and triols) have been reported to be strongly toxic to a number of cultured human tumoral and normal cell lines. This toxicity was previously demonstrated to occur via the induction of apoptosis in cells (Iordana

et al., 2009; Keschutnig et al., 2006; Hovenkamp et al., 2008). Due to the structural similarity of sterols 2 and 3 with oxidized phytosterols, it can be supposed that the mechanism of their cytotoxicity is similar.

In conclusion, our study has demonstrated that a triterpene and two sterols isolated from *M. geometrizans* possess *in vivo* and *in vitro* activities such as suppressing inflammation and the viability of cancer cell lines. These novel bioactivities would provide greater insight into their medicinal value and contribute to the knowledge of guaranibulbo. The anti-inflammatory activity displayed by compound 1, and its presence in aerial parts of *M. geometrizans* (Céspedes et al., 2005), could explain the use of the aerial parts of this species in traditional medicine.

#### Acknowledgements

J. R. Salazar thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for a scholarship for his doctoral studies at Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. The authors are grateful to Rocío Patiño, Hector Ríos, Luis Velasco, and Nieves Zabala for technical assistance.

- Akihisa T. and Yasukawa K. (2001). Antitumor promoting and anti-inflammatory activities of triterpenoids and sterols from plants and fungi. *Strobes Nat. Prod. Chem.* 25, 43–87.
- Céspedes A. C., Salazar J. R., Martínez-Vázquez M., and Aranda E. (2006). Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Mytillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera pyrausta* and *Imecbis morio*. *Phytochemistry* 66, 2481–2493.
- de Souza Pereira R. (2005). Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors used for preventing or regressing cancer. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 4, 157–165.
- Di Rosa M. (1972). Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 89–100.
- Djerassi C., Bursiedn S., Estrada H., Leirin A., Lippman A., Manjanz A., and Mousnier H. G. (1957). Triterpenoids XXVIII. The triterpene composition of the genus *Mytillocactus*. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3525–3528.
- Djerassi C., Murray R. D. H., and Villotti R. (1965). The structure of the cactus sterol, pentacetal (cholest-8-ene-3 $\alpha$ -diol). *J. Chem. Soc.* 1160–1165.
- Dolcet X., Lobet D., Pallares J., and Matias-Guiu X. (2005). NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 446, 175–182.
- Fitzpatrick B., Mehbel M., Cowen R. L., and Stratford L. J. (2008). i-NOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. *Nitric Oxide* 19, 211–224.
- Flores-Rosero G. and Martínez-Vázquez M. (2008). Anti-inflammatory and cytotoxic cyclotaxans from guayule (*Parthenocissis argentea*). *Nat. Prod. Commun.* 3, 413–422.
- Hovenkamp E., Demonty I., Flut J., Lijbbaert D., Mensink R. P., and Trautwein E. A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Prog. Lipid Res.* 47, 37–49.
- Khong P. and Lewis K. (1975). New triterpenoid extracts from *Lemniscoccus dichape*. *Aust. J. Chem.* 28, 165–172.
- Kircher H. W. and Bird H. L. (1982). Five  $3\alpha,6\beta$ -dihydroxysterols in organ-pipe cactus. *Phytochemistry* 21, 1725–1710.
- Knight J. C. and Petit G. R. (1969). Arizona flora: the sterols of *Leurococcus greggii*. *Phytochemistry* 8, 477–482.
- Knight J. C., Wilkinson D. L., and Djerassi C. (1966). The structure of the cactus seryl manihagallin (14 $\alpha$ -methyl- $\Delta^1$ -cholest-8-ene- $3\beta,6\alpha$ -diol). A novel link in sterol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 793–798.
- Keschutnig K., Heikkinen S., Komrocz E., Lampi A.-M., Pironen V., and Wagner K. H. (2009). Cytotoxic

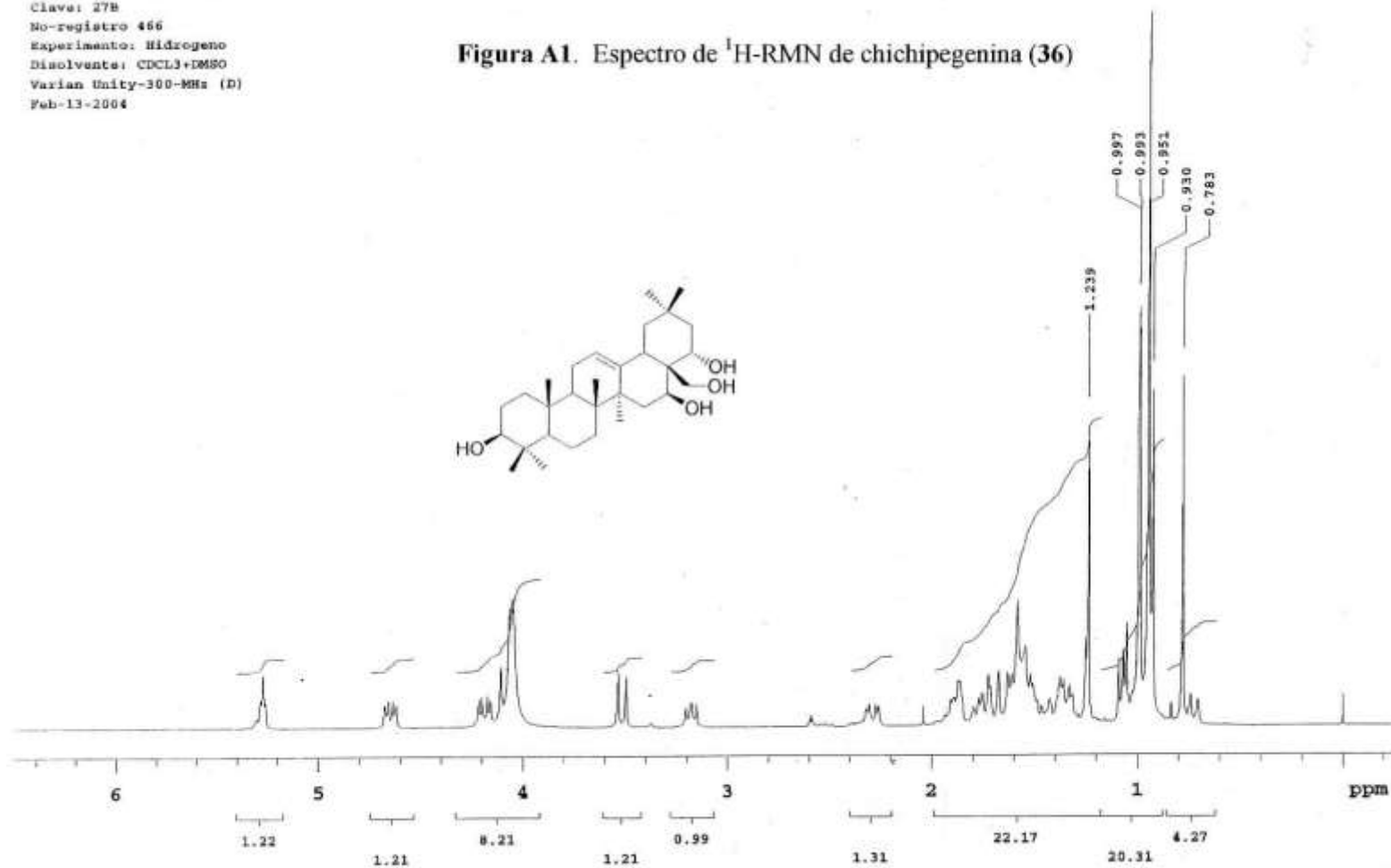
- and apoptotic effects of single and mixed modes of  $\beta$ -sitosterol on HepG2-cells. *Toxicol. In Vitro* **23**, 755–762.
- Kundu J. K. and Saha Y. J. (2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* **659**, 15–30.
- Lordana S., Mackrill J. J., and O'Brien N. M. (2009). Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative disease. *J. Nutr. Biochem.* **20**, 321–336.
- Luna-Morales C. and Aguirre R. (2001). Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de la pitaya mexicana en México. *Interciencia* **26**, 18–24.
- Mantovani A., Allavena E., Sica A., and Balkwill F. (2008). Cancer related inflammation. *Nature* **454**, 436–444.
- Murakami M., Kumaki Y., Yoshitani T., and Yoshizaki E. (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol.* **71**, 1331–1336.
- Oviedo-Chevez I., Ramirez-Apan T., Soto-Hernandez M., and Martinez Vazquez M. (2004). Principles of the bark of *Arctostaphylos uva-ursi* (Jussieu) (Ericaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* **11**, 428–445.
- Oviedo-Chevez I., Ramirez-Apan T., and Martínez-Vázquez M. (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of truzallane-type triterpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 1067–1092.
- Parra-Delgado H., Compagne C. M., Ramirez-Apan T., Ostrosky-Wegman P., and Martínez-Vázquez M. (2006). Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentaun B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines. *Biorg. Med. Chem.* **14**, 1889–1901.
- Sánchez L. and Moreno J. J. (1999). Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **57**, 119–131.
- Sanchez Gonzalez A., Granados Sanchez D., and Simon-Nabor R. (2008). Uso medicinal de las plantas por los otomies del municipio de Nicolas Flores Hidalgo, México. *Rev. Chaparro Hort.* **14**, 271–279.
- Sandoval A., Manjarrez A., Leeming P. R., Thomas G. H., and Djerassi C. (1957). Terpenoids. XXX. The structure of the pactus triterpene chichiogenin. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4168–4172.
- Seibert K., Zhang Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., and Perkins W. (1994). Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12013–12017.
- Wang X. and Lin Y. (2008). Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 1275–1288.
- Wink D. A., Rizkour L. A., Hussain S. P., and Harris C. C. (2003). The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric Oxide* **19**, 65–67.



## **ANEXO 2. ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

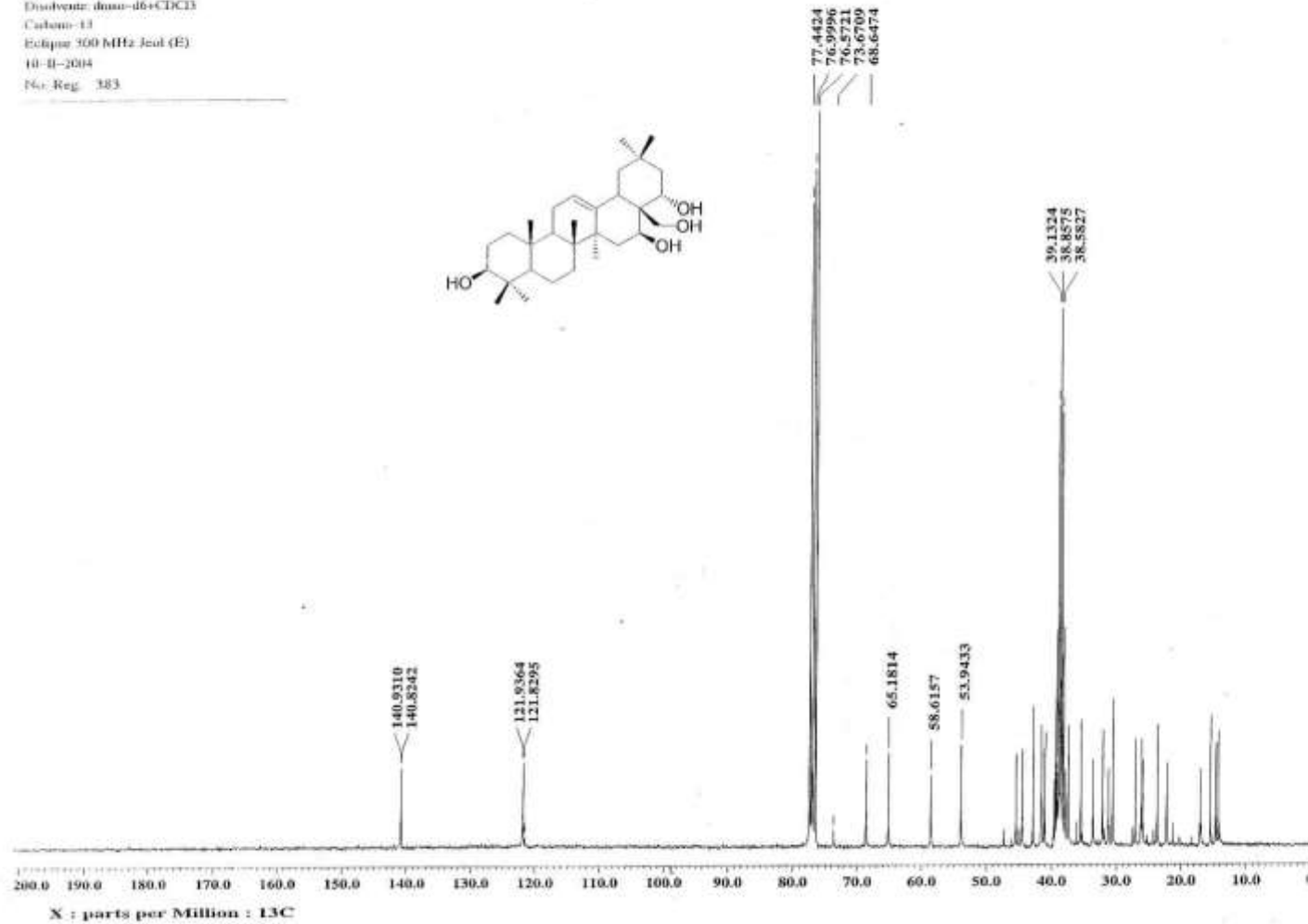
Instituto de Química, UNAM (HR)  
Dr. Mariano-Mtz/Rodrigo-S.  
Clave: 27B  
No-registro 466  
Experimento: Hidrogeno  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>+DMSO  
Varian Unity-300-MHz (D)  
Feb-13-2004

Figura A1. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de chichipegina (36)



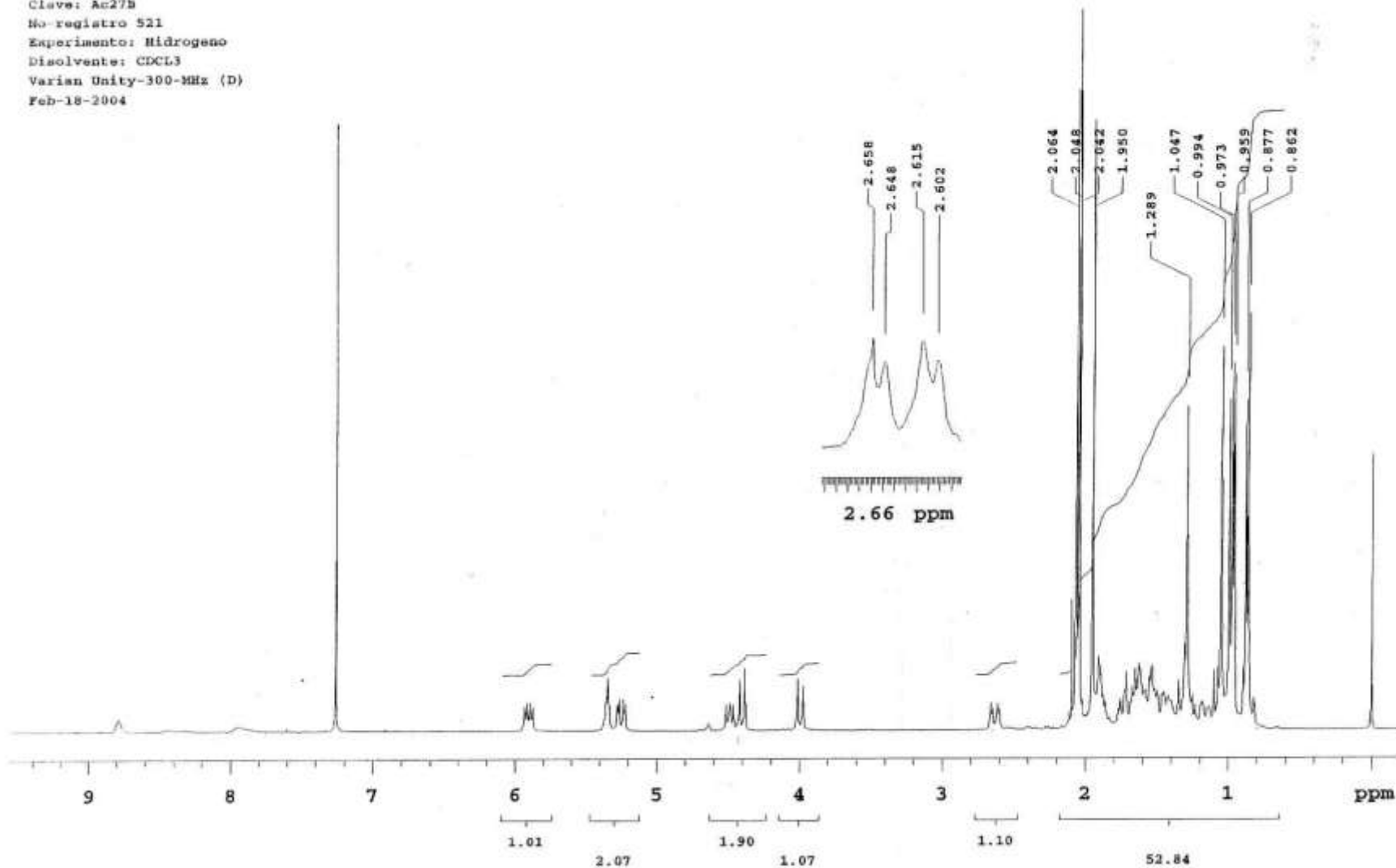
URAM, INSTITUTO DE QUIMICA, spg  
Dr. Carlos Caspedes / Rodrigo Salazar  
Clave: 27 B  
Disolvente: dmsu-d6+CDCl3  
Cubeno-13  
Equipo: 500 MHz Jeol (E)  
10-11-2004  
No. Reg. 383

Figura A2. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de chichipegina (36)



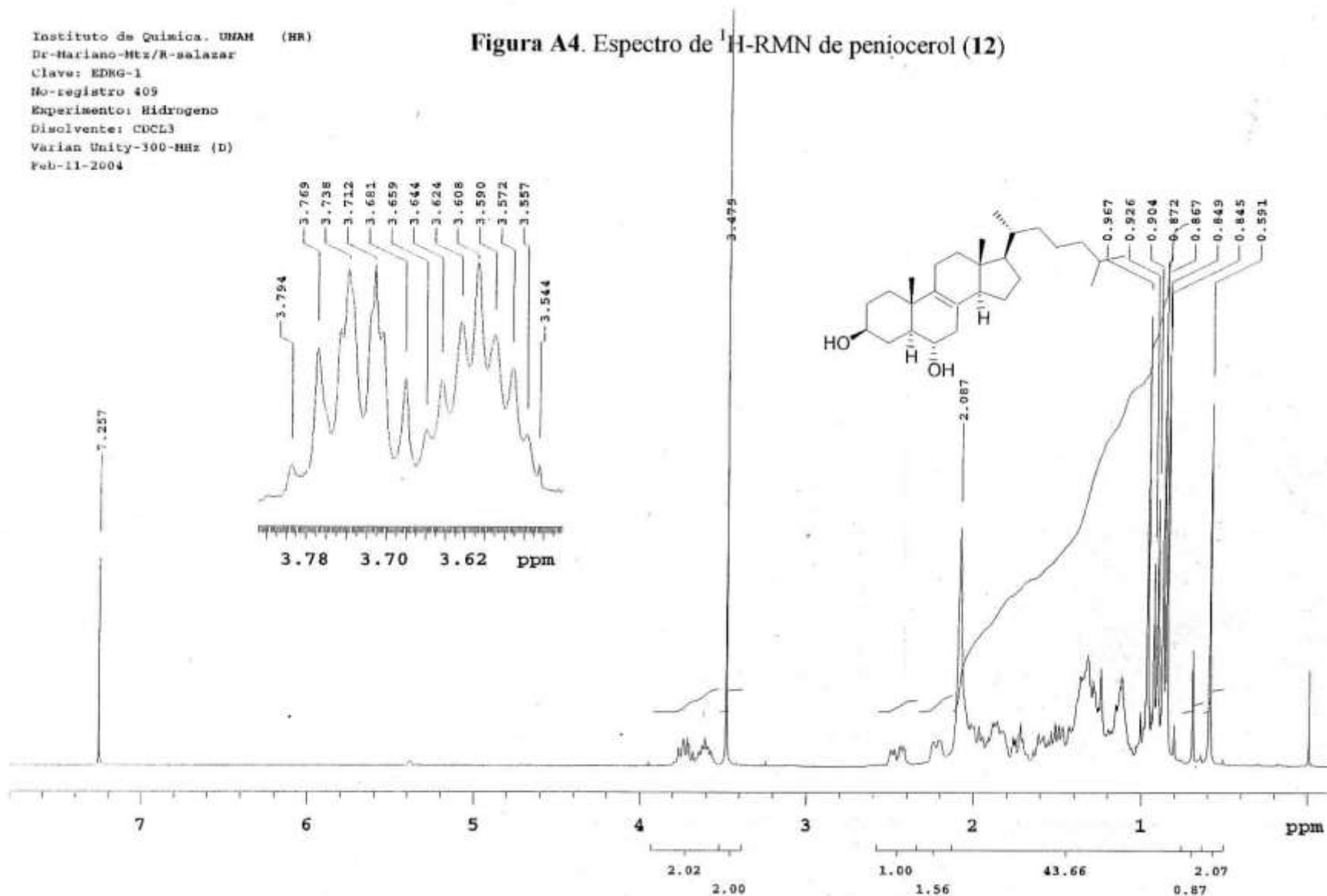
Instituto de Química. UNAM (HR)  
Dr. Mariano-Mtz/Rodrigo-Z.  
Clave: Ac27B  
No-registro 521  
Experimento: Hidrogeno  
Disolvente: CDCL3  
Varian Unity-300-MHz (D)  
Feb-18-2004

Figura A3. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de tetraacetato de chichipegina (36Ac)



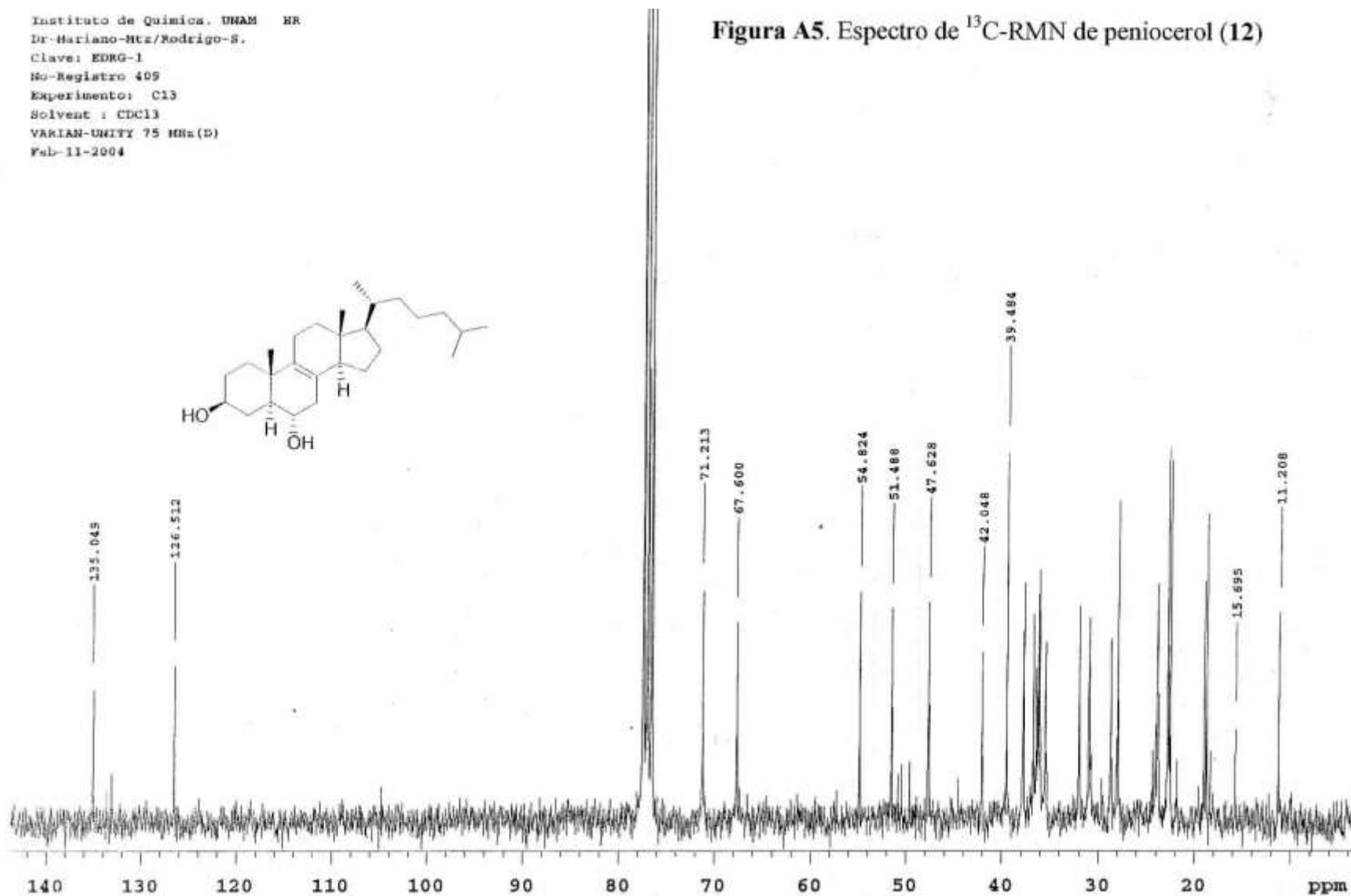
Instituto de Quimica, UNAM (HR)  
Dr-Mariano-Mtz/R-salazar  
Clave: EDRG-1  
No-registro 409  
Experimento: Hidrogeno  
Disolvente: CDCL3  
Varian Unity-300-MHz (D)  
Feb-11-2004

Figura A4. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de peniocerol (12)



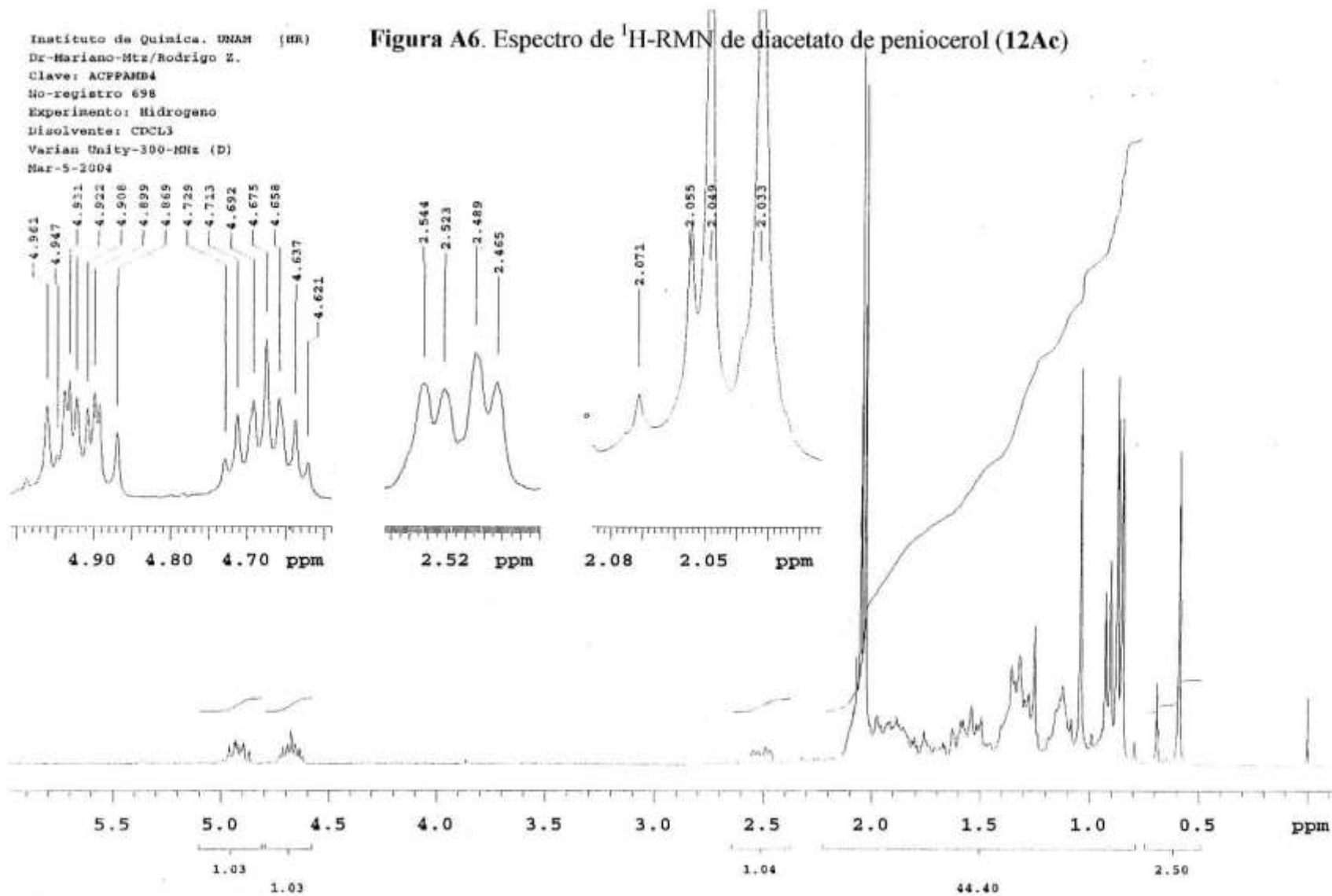
Instituto de Quimica. UNAM HR.  
Dr. Mariano-Htz/Rodrigo-S.  
Clave: EDRG-1  
No-Registro 409  
Experimento: C13  
Solvent : CDCl3  
VARIAN-UNITY 75 MHz(D)  
Feb-11-2004

Figura A5. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de peniocerol (12)



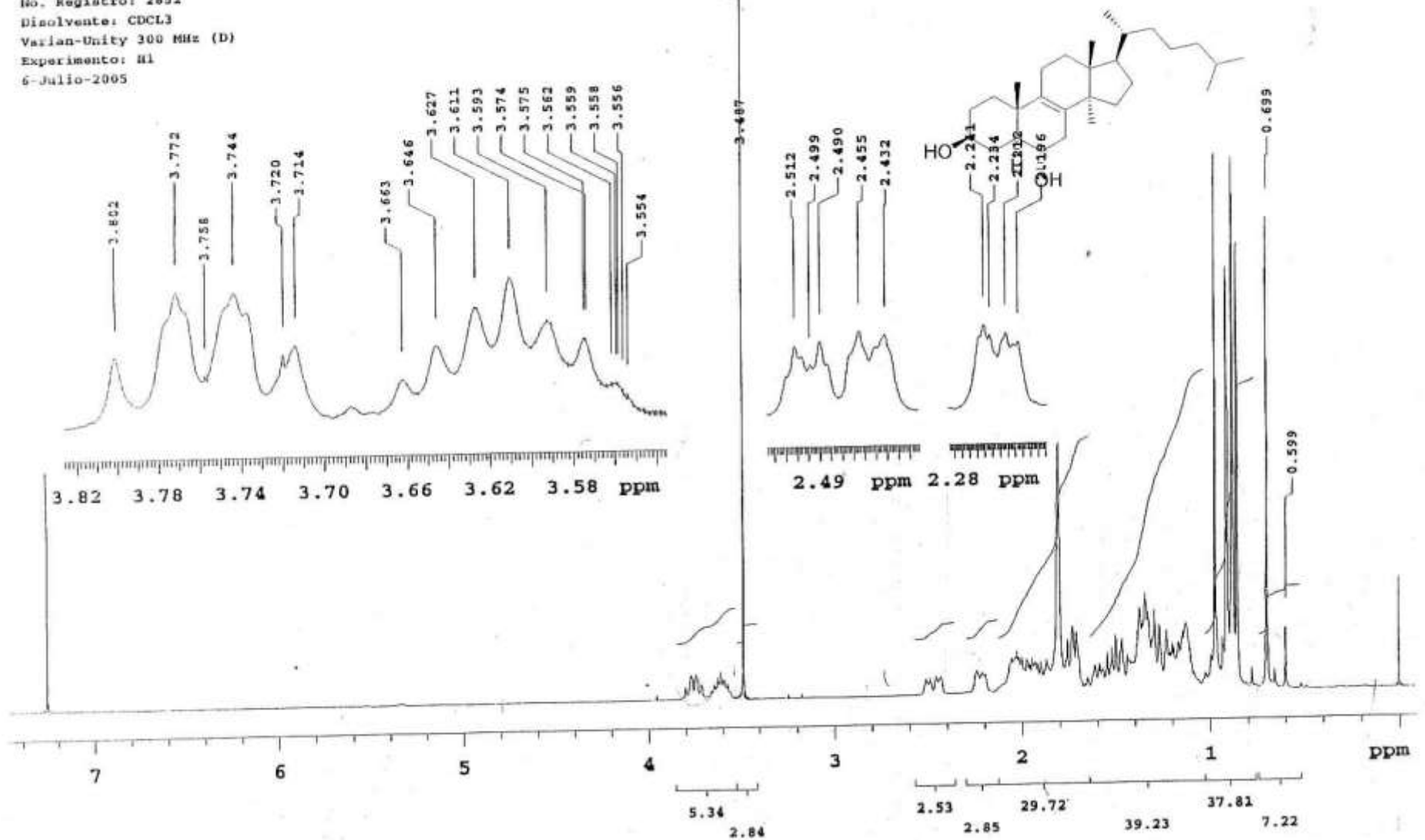
Instituto de Quimica. UNAM (HR)  
 Dr-Mariano-Mtz/Rodrigo Z.  
 Clave: ACPFMB4  
 No-registro 698  
 Experimento: Hidrogeno  
 Disolvente: CDCL3  
 Varian Unity-300-MHz (D)  
 Mar-5-2004

Figura A6. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de diacetato de peniocerol (12Ac)



Instituto de Química UNAM (IQM),  
Dr. Mariano Martínez / M. Cordova  
Clave: P-98-100  
No. Registro: 2852  
Disolvente: CDCL<sub>3</sub>  
Varian-Unity 300 MHz (D)  
Experimento: H1  
6-Julio-2005

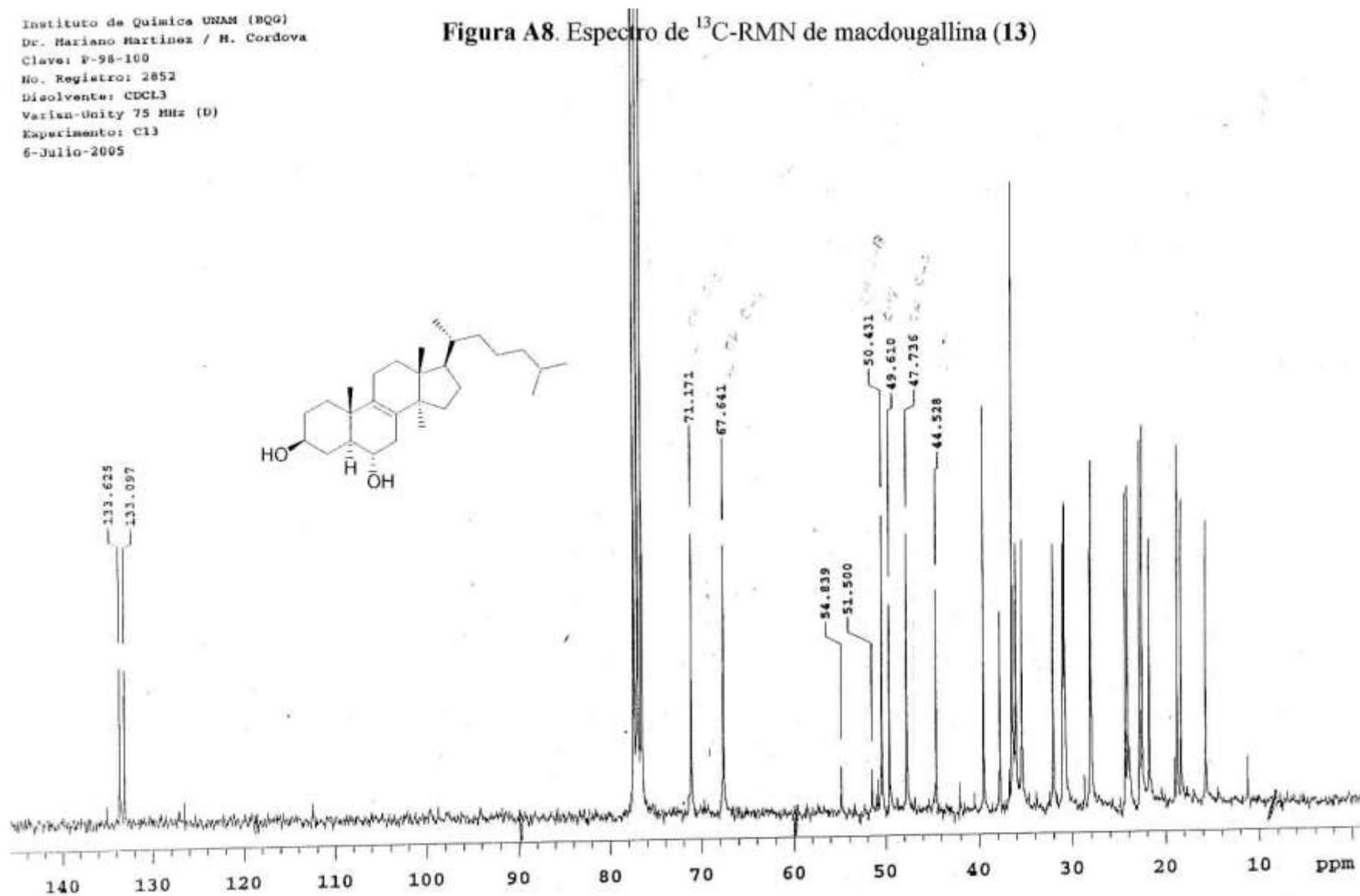
Figura A7. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de macdougallina (13)





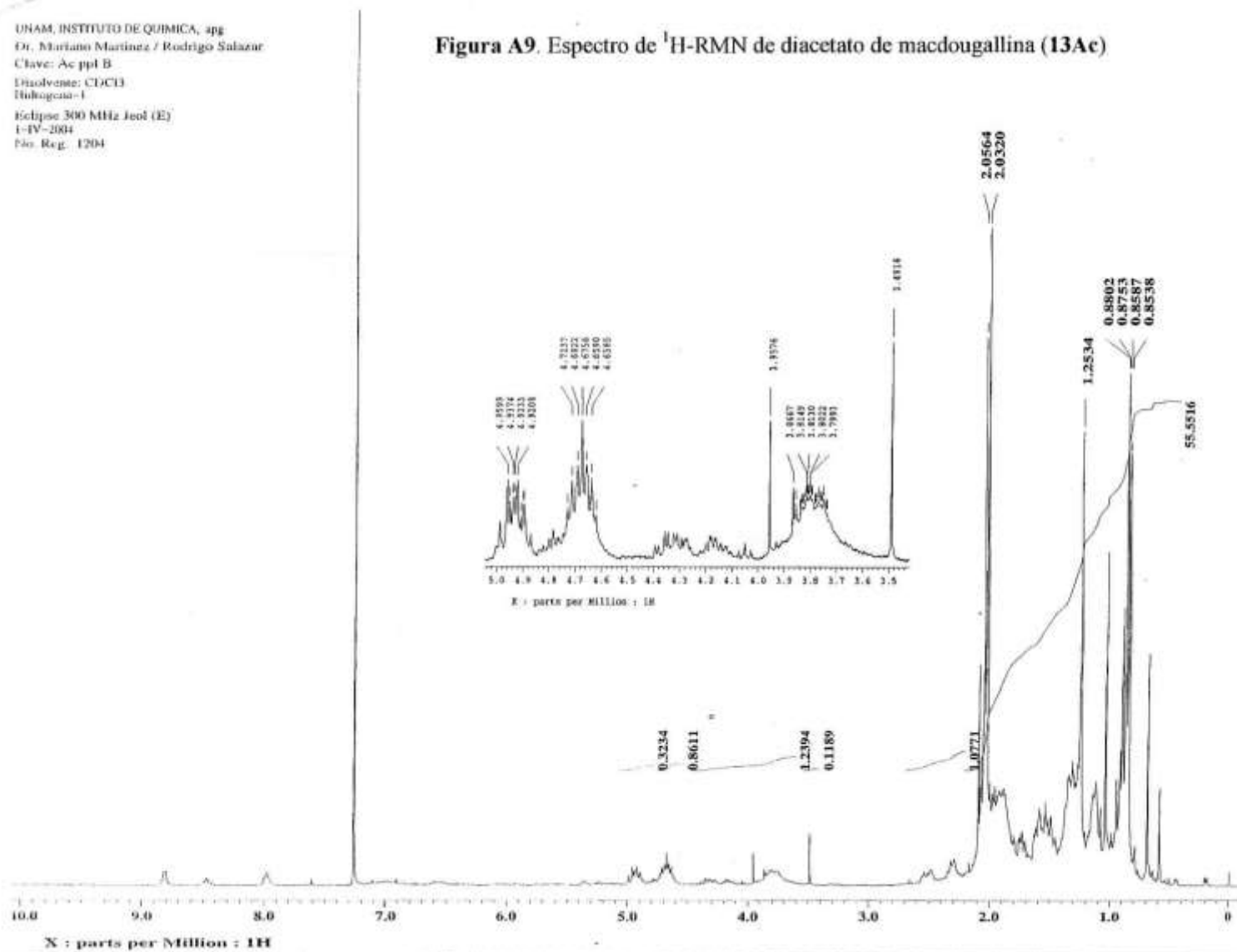
Instituto de Química UNAM (BQO)  
Dr. Mariano Martínez / M. Cordova  
Clave: P-98-100  
No. Registro: 2852  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Varian-Unity 75 MHz (D)  
Experimento: C13  
6-Julio-2005

Figura A8. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de macdougallina (13)



UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, spg  
 Dr. Mariano Martínez / Rodrigo Salazar  
 Clave: Ac ppt B  
 Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
 Tubogca-1  
 Eclipse 300 MHz Jeol (E)  
 1-IV-2004  
 No. Reg. 1204

Figura A9. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de diacetato de maddockallina (13Ac)



U.N.A.M. Instituto de Química IQI  
 Dr. Mariano Rtz/L. Guadarrama  
 Clave: 52215H  
 Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
 Experimento: 1H  
 Varian Inova 500 MHz (G)  
 No. de registro 0710  
 25-02-08  
 File: st4h  
 Pulse Sequence: s2pul

Figura A10. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de ácido oleanólico (26)

