



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE CITOTOXICIDAD INDUCIDO POR
ESTEROLES Y TRITERPENOS AISLADOS DE *Myrtillocactus geometrizans***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARIO AUGUSTO BOLAÑOS CARRILLO

TUTOR PRINCIPAL

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ(INSTITUTO DE QUÍMICA)

COMITÉ TUTOR

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA(INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS)**

DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA(FACULTAD DE MEDICINA)

MÉXICO, D.F, AGOSTO DE 2015



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.

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

La evaluación de la actividad biológica se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán perteneciente al departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM bajo la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa y M.C. Jose Luis Ventura Gallegos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por la formación recibida

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida durante los estudios de Doctorado

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por su apoyo para la realización del proyecto y por darme la oportunidad de incorporarme a su equipo de investigación en estos años

Al Dr. Alejandro Zentella por su gran apoyo incondicional en mi formación doctoral y por darme la oportunidad también de pertenecer a su grupo de investigación

Al M.C. Jose Luis Ventura Gallegos por su guía y apoyo en cada uno de los experimentos realizados en los estudios de Doctorado y su amistad

Al Dr. Jorge Meléndez Zajgla por sus aportaciones a mi comité tutorial

A los técnicos de Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas, y Pruebas Biológicas por su asistencia técnica en la obtención de los compuestos utilizados

DEDICATORIAS

A Dios a través de la intercesión de San Judas Tadeo por darme la oportunidad de vivir esta gran experiencia y poder crecer como ser humano

A mi mamá por su apoyo incondicional en todos los aspectos y por su gran comprensión durante todos mi estudios de doctorado. Esta meta también es gracias a ti.

A mi hermana y sus hijos por su apoyo, consejos y motivación para la obtención de esta meta

A mi papá por su influencia en la realización y conclusión de mis estudios de doctorado

A mi novia Ekaterina quien me ha motivado con su amor y cariño en la terminación de esta etapa de mi vida

A mis demás familiares, sobrinos, primos, tios; que también me motivaron a terminar mis estudios de doctorado

A mis compañeros y amigos de laboratorio que acompañaron durante todo el proceso del doctorado

A todos aquellos que durante mis estudios de Doctorado estuvieron cerca de mi

ÍNDICE

ÍNDICE	5
LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	13
2.1 Descripción de la familia Cactaceae Juss., 1789	13
2.2 Descripción botánica del género <i>Myrtillocactus Buxb., 1958</i>	13
2.3 Descripción botánica de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	14
2.4 Usos etnobotánicos de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	16
2.5 Triterpenos y esteroides aislados de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	16
2.6 Actividad biológica de esteroides y triterpenos aislados de <i>M.geometrizans</i>	18
2.7 Genotoxicidad de esteroides y triterpenos	19
2.8 Actividad antiproliferativa de esteroides y triterpenos	20
2.9 Actividad citostática de esteroides y triterpenos	21
2.10 Actividad apoptótica de esteroides y triterpenos	21
2.11 Actividad moduladora de NF-kB por esteroides y triterpenos	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 General	24
4.2 Particulares	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Aislamiento de peniocerol, macdougallina y chichipegina	25
5.1.1 Colecta	25
5.1.2 Maceración	25
5.1.3 Separación	26
5.1.4 Purificación de los compuestos presentes en el extracto metanólico	26
5.1.5 Identificación de los compuestos peniocerol, macdougallina y	

chichipegénina	27
5.2 Evaluación de la actividad genotóxica	27
5.2.1 Animales	27
5.2.2 Ensayo de micronúcleos	27
5.3 Evaluación de la actividad citotóxica, citostática y apoptótica	28
5.3.1 Ensayo de Cristal Violeta	28
5.3.2 Ensayo de Ciclo Celular	29
5.3.3 Ensayo de Apoptosis con Anexina V y IP	30
5.3.4 Ensayo de Western Blot	31
5.4 Análisis estadísticos	31
6. RESULTADOS	32
6.1 Aislamiento de peniocerol, macdougallina y chichipegénina	32
6.2 Evaluación de la actividad genotóxica de peniocerol, macdougallina y chichipegénina	35
6.3 Evaluación de la actividad citotóxica, citostática y apoptótica	37
6.3.1 Evaluación de la actividad citotóxica	37
6.3.2 Evaluación de la actividad citostática	38
6.3.3 Evaluación de la actividad apoptótica	42
6.3.4 Evaluación de la activación de PARP	45
7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIONES	49
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
10. ANEXOS	57
10.1 Artículo publicado	
10.2 Espectros	

LISTA DE ABREVIATURAS

MS	Metabolitos secundarios
IP	Yoduro de propidio
CC	Cromatografía en columna
TLC	Cromatografía en placa fina
UI	Unidades Internacionales
IR	Espectroscopia de infrarrojo
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
EM	Espectrometría de masas
DMSO	Dimetilsulfóxido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localización de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	14
Figura 2. <i>Myrtillocactus geometrizans</i> en su medio natural	15
Figura 3. Algunos triterpenos aislados de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	17
Figura 4. Esteroles aislados de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	17
Figura 5. Zona de colecta de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	25
Figura 6. Maceración de raíz y partes aéreas de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	26
Figura 7. Estructura del cristal de peniocerol obtenida por difracción de rayos X.	33
Figura 8. Efectos sobre la distribución del ciclo celular inducidos por peniocerol y macdougallina sobre HCT-15 a 24 h.	40
Figura 9. Efectos sobre la distribución del ciclo celular inducidos por peniocerol y macdougallina sobre MCF-7 a 24 h.	41
Figura 10. Graficas representativas de puntos (dot plots) de las células HCT-15 tratadas con peniocerol y macdougallina a 40 μ M.	43
Figura 11. Graficas representativas de puntos (dot plots) de las células MCF-7 tratadas con peniocerol y macdougallina a 40 μ M.	44
Figura 12. Western Blots de las células HCT-15 tratadas con peniocerol y macdougallina durante 12,24 y 36 h.	45
Figura 13. Western Blots de las células MCF-7 tratadas con peniocerol y macdougallina durante 12,24 y 36 h.	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación biológica de peniocerol, macdougallina, chichipegénina y sus derivados.	19
Tabla 2. Características de los compuestos aislados de <i>M. geometrizans</i>	35
Tabla 3. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados intraperitonealmente con peniocerol.	35
Tabla 4. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados intraperitonealmente con macdougallina.	36
Tabla 5. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados intraperitonealmente con chichipegénina	36
Tabla 6. Actividad de inhibición del crecimiento celular (IC_{50}) 24 y 48 horas después del tratamiento con peniocerol.	37
Tabla 7. Actividad de inhibición del crecimiento celular (IC_{50}) a 24 y 48 horas después del tratamiento con macdougallina	37
Tabla 8. Efectos de peniocerol y macdougallina sobre la distribución del ciclo celular en las células HCT-15 y MCF-7.	39
Tabla 9. Porcentaje de apoptosis inducida por peniocerol o macdougallina en células HCT-15 a 24 h	42
Tabla 10. Porcentaje de apoptosis inducida por peniocerol o macdougallina en células MCF-7 a 24 h.	44

RESUMEN

Se determinaron las actividades genotóxicas y citotóxicas de los esteroides: peniocerol y magdougallina así como del triterpeno chichipegenina mediante el ensayo de micronucleos y cristal violeta respectivamente. También se demostró la inducción de apoptosis en células cancerosas por éstos tres metabolitos secundarios aislados de *Myrtillocactus geometizans* mediante el ensayo de Anexina-V-Yoduro de propidio así como por el ensayo de fragmentación de PARP.

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que éstos tres metabolitos secundarios no son genotóxicos. De manera interesante solo peniocerol y macdougallina detuvieron el ciclo celular en la fase G₀/G₁ e indujeron la muerte celular por apoptosis.

Nuestros hallazgos demostraron que los esteroides peniocerol y macdougallina poseen actividades biológicas relevantes para la conservación y uso racional de *Myrtillocactus geometizans* como fuente de sustancias útiles en el tratamiento y prevención del cáncer.

ABSTRACT

The genotoxic and cytotoxic activities of sterols peniocerol, macdougallin and chichipegenin were evaluated by micronucleous and crystal violet assay respectively. Induction of apoptosis on cancer cells determined by Annexin-V-Propidium iodide and fragmentation PARP of peniocerol, macdougallina as well as chichipegenina, all isolates from *Myrtillocactus geometizans* were evaluated too.

On the other hand, our results showed that peniocerol, macdougallin as well as chichipegenin are not genotoxic. Furthermore, only peniocerol and macdougallina arrested the cell cycle in the G_0 / G_1 phase and induced cell death by apoptosis.

These findings show that sterols peniocerol and macdougallin have relevant biological activities that justify the conservation and rational use of *Myrtillocactus geometrizans* as a source of useful substances in the treatment and prevention of cancer

1. INTRODUCCIÓN

El uso, en la medicina tradicional mexicana, de las cactáceas para el tratamiento de diversas enfermedades tiene su origen desde tiempos prehispánicos [1]. Un ejemplo es el peyote (*Lophophora williamsii*), el cual ha sido utilizado como analgésico y antirreumático. Otro ejemplo lo constituye lo que comúnmente se menciona como “pata de venado” (*Ariocarpus kotschoubeyanus*), la cual se ha utilizado para aliviar golpes severos y hemorragias internas. Otra cactácea que también se ha utilizado por sus beneficios medicinales son los tallos del “etcho” (*Pachycereus pecten-aboriginum*) especie que se ha utilizado para curar úlceras gástricas así como para calmar dolores reumáticos y procesos inflamatorios [2].

Como se puede apreciar el uso de las cactáceas para fines terapéuticos ocupa un lugar importante en la medicina tradicional mexicana. Sin embargo a pesar del uso extendido como remedios herbolarios, principalmente en las regiones rurales del país, pocos son los estudios acerca de las propiedades biológicas así como de la toxicidad de dichas especies.

Por ejemplo, a pesar de que el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) ha sido utilizado en la región Otomí de Oaxaca, como agente antiinflamatorio no se conocía ningún estudio acerca de sus supuestas actividades terapéuticas. A pesar de que se conocía, desde la década de los cincuentas, que esta especie se caracteriza por sintetizar esteroides y triterpenos de tipo oleanano [3]. Tomando en cuenta lo anterior, nuestro grupo decidió evaluar las posibles propiedades antiinflamatorias de ésta especie.

Nuestros resultados demostraron que los metabolitos secundarios responsables de las propiedades antiinflamatorias de *M. geometrizans* era los esteroides: peniocerol y macdougallina así como el triterpeno chichipegenina [1]

No obstante estos hallazgos, aún se desconocen algunos aspectos fundamentales de la actividad biológica de estos metabolitos secundarios. Por lo anterior, en el presente trabajo se presentan los resultados de las evaluaciones de las propiedades genotóxicas y antiproliferativas del peniocerol, la macdougallina y

la chichipegénina. También se presentan los probables mecanismos de muerte celular, inducidos por estos metabolitos secundarios en células cancerosas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción de la familia Cactaceae Juss., 1789

La familia Cactácea es originaria de América e incluye tres subfamilias: la Cactoidae, la Opuntioideae y la Pereskioideae con aproximadamente 1500 especies, de las cuales se estima que en México existen cerca de 700 especies agrupadas en 68 géneros [4,5,6].

Una de las características más importantes de esta familia es la presencia de un órgano denominado areola; el cual se considera como yemas homólogas a las yemas axilares de otras especies de dicotiledoneas. Las yemas de las cactáceas, o areólas, forman también hojas reducidas, flores, nuevos tallos y espinas, glóquidas, cerdas y pelos, y a veces raíces adventicias [4] tomado de [1].

2.2 Descripción botánica del género Myrtillocactus Buxb.,1958

El género *Myrtillocactus* está compuesto por cuatro especies que son *M.cohal*, *M.schenckii*, *M. eichlamii* y *M. geometrizzans*. [3] Dicho género pertenece a la familia Cactoidae, tribu Pachycereeae. Posee especies arborescentes con tronco bien definido, ramosas, costillas escasas, areolas grandes con espinas gruesas y más o menos largas. Poseen 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 color mate,

papilosa; hilo casi basal, con micrópilo hundido; embrión curvo y cotiledones anchos.

La distribución de las cuatro especies varía según la zona geográfica, *M.eichlammi* (Britton et Rose) se encuentra distribuida desde Guatemala pasando por el centro y norte de México. *M.shenkii* (Purpus) Britton et Rose se encuentra en el centro del país. *M.geometrizzans* (Martius) Console se encuentra hasta el altiplano Mexicano y *M.cochal* (Orcutt) Britton et Rose solo se encuentra en regiones del desierto de Sonora y el estado de Baja California. Se conocen con el nombre común de “garambullos”, aunque en cada región adoptan nombres locales [4 y 5] tomado de [1].



Figura 1. Mapa de localización de *Myrtillocactus geometrizzans* (Elaboración propia con datos de [1]).

2.3 Descripción botánica de *Myrtillocactus geometrizzans*(Martius)Console 1897

Presenta 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 si 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 de 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 verdoso; varias en la misma areola; segmentos del perianto oblongos, de 1.5 centímetros de longitud, se extienden ampliamente; estambres numerosos, excertos 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 [4] tomado de [1].



Figura 2. *Myrtillocactus geometrizans* en su medio natural (fotografía tomada en Cardonal Hidalgo, Abril 2012)

2.4 Usos etnobotánicos de *Myrtillocactus geometrizans*

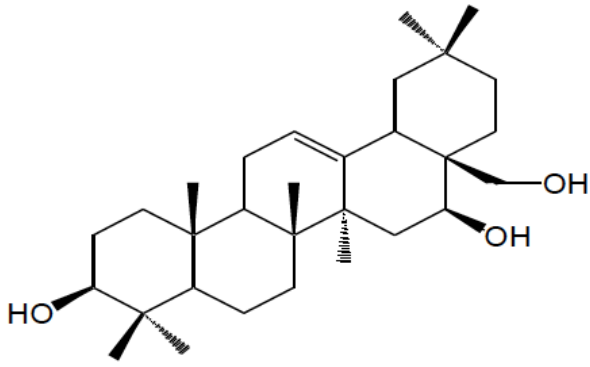
Según Casas [7], existen estudios que establecen la gran importancia de las cactáceas columnares en Mesoamérica, incluyendo a *M.geometrizans*, de la cual menciona que los usos de esta especie incluían el consumo de tallos, flores y frutos, el uso de frutos para la preparación de bebidas alcohólicas, como forraje, y como cerco vivo.

Por otro lado en poblaciones como Zapotitlan Salinas, Puebla y otras en los estados de: Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro y Guanajuato, los frutos se consumen como alimento fresco. Mientras que los tallos se utilizan como alimento forrajero y la planta entera se utiliza como cerco vivo.[8,9,10,11,12].

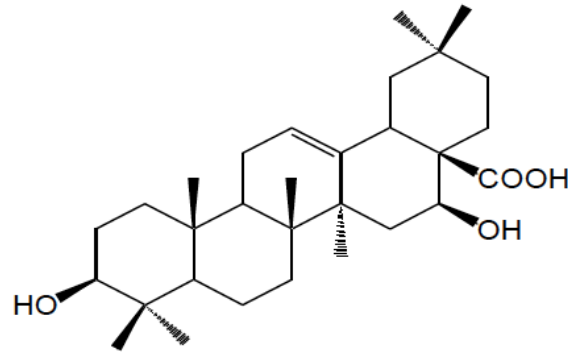
Estudios etnomédicos de esta especie indican que, en la zona Mixteca de Oaxaca y en el municipio de Nicolás Flores, Hidalgo se utilizan emplastos de los tallos contra fracturas y golpes fuertes [13,14].

2.5 Triterpenos y esteroides aislados de *Myrtillocactus geometrizans*

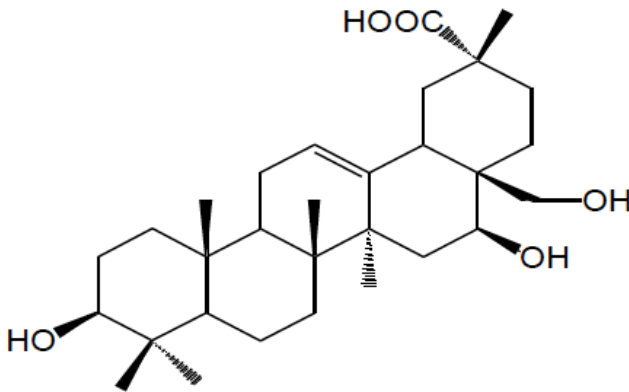
Los estudios pioneros sobre el contenido químico de *M. geometrizans* fueron desarrollados por Carl Djerassi en 1957 [15]. Estos estudios demostraron que esta especie es rica en triterpenos dentro de los que destacan la longispinogenina, la chichipegenina y los ácidos cochálico y mirtillogénico. También se identificó que ésta especie sintetiza gran cantidad de esteroides entre los que destacan el peniocerol y la macdougallina [1]. Este último con un inusual metilo en C-14. Con la finalidad de encontrar esteroides con alquilos en C-14 se realizó el estudio de las raíces de otras cactáceas. Los resultados indicaron la presencia peniocerol en pocas especies del género *Peniocereus* y del *M. geometrizans*.



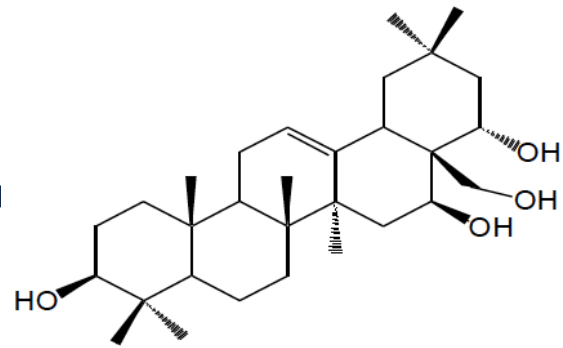
Longispinogenina



Ácido cochálico

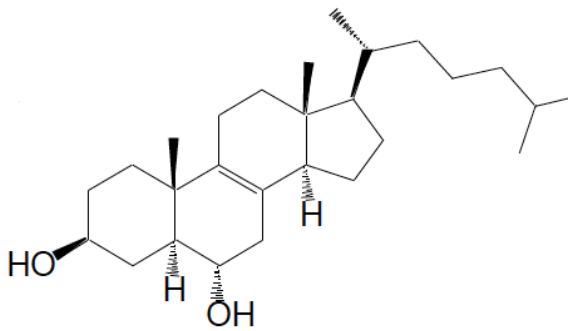


Ácido Mirtillogénico

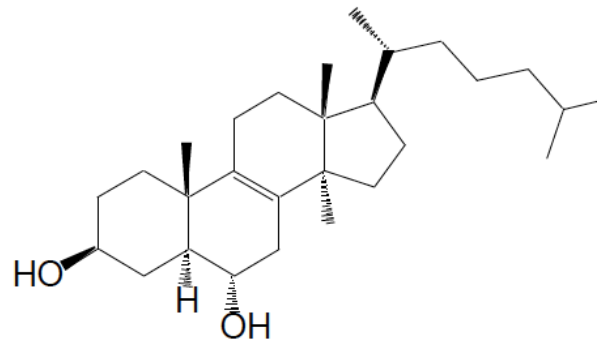


Chichipegenina

Figura 3. Algunos triterpenos aislados de *Myrtillocactus geometrizans*



Peniocerol



Macdougallina

Figura 4. Esteroles aislados de *Myrtillocactus geometrizans*

2.6 Actividad biológica de esteroides y triterpenos aislados de *Myrtillocactus geometrizans*

El peniocerol, la macdougallina y la chichipegénina así como algunos de sus derivados han sido evaluados en diversos modelos de actividad biológica tales como: regulación del crecimiento de insectos, actividad antiinflamatoria *in vivo*, producción de óxido nítrico en macrófagos de ratón, actividad mieloperoxidasa (MPO), proliferación de líneas celulares de cáncer humano y en modelos de permeabilidad mitocondrial.

Modelo	Parámetro de evaluación	Extractos o compuesto activos
Efectos regulatorios del crecimiento de insectos <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Tenebrio molitor</i> [52]	Efectos inhibitorios del crecimiento del insecto	Peniocerol, Macdougallina Mezcla de Peniocerol y Macdougallina (1:1) Extractos de metanol y CH ₂ Cl ₂ de las partes aéreas de <i>M. geometrizans</i>
Edema en oreja de ratón inducido por TPA[27]	% de inhibición del edema	Extractos de hexano, CH ₂ Cl ₂ y MeOH de raíz de <i>M. geometrizans</i> Extractos de hexano y de MeOH de las partes aéreas de <i>M. geometrizans</i> Producto bruto de la reacción de hidrólisis del extracto de metanol de las partes aéreas de <i>M. geometrizans</i> Los metabolitos secundarios: Chichipegénina, peniocerol, macdougallina Derivados acetilados de: chichipegénina, peniocerol y macdougallina
Edema inducido por EPP(fenilpropiolato de etilo) [1]	% de inhibición del edema	Chichipegénina, peniocerol macdougallina Derivados acetilados de: chichipegénina, peniocerol y macdougallina
Edema inducido por carragenina en pata de rata[27]	% de inhibición del edema	Peniocerol, macdougallina

Producción de óxido nítrico en macrófagos de ratón[1]	Aumento de la concentración de Nitritos	Peniocerol
Actividad de la enzima mieloperoxidasa[1]	Actividad de mieloperoxidasa evaluada por densidad óptica	Peniocerol
Inhibición de la proliferación de líneas celulares de cáncer humano determinado por el método de Sulforrodamina B[27]	% de inhibición del crecimiento de células de cánceres humanas	Peniocerol, macdougallina y derivado acetilado de chichipegénina.
Permeabilidad mitocondrial [53]	Permeabilización de membrana mitocondrial	Peniocerol

Tabla 1. Evaluación biológica de peniocerol, macdougallina, chichipegénina y algunos de sus derivados.

2.7 Genotoxicidad de esteroides y triterpenos

Hoy en día se conoce que varios de los fármacos utilizados en la quimioterapia, no sólo ejercen su acción citotóxica en células cancerosas sino que también ejercen toxicidad en las células no cancerosas.

Adicionalmente existen numerosos informes acerca de la formación de tumores secundarios como consecuencia del tratamiento de quimioterapia del tumor primario [16]. Por ejemplo los llamados alcaloides de vinca (vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina) actualmente utilizados como fármacos anticancerosos, en un ensayo *in vivo* de micronúcleos en células de médula ósea y sangre periférica de ratón indujeron la formación de micronúcleos, a dosis terapéuticas utilizadas en la clínica (0.01-40 mg/kg) [17]. Otro ejemplo es el paclitaxel, el cual en el modelo de micronúcleos en médula ósea de ratón a dosis a partir de 50 mg/kg (dosis cercanas a las terapéuticas) mostró efectos genotóxicos importantes [18].

Por otro lado, existen metabolitos secundarios como la pristimerina un triterpeno aislado de especies del género *Celastrus*, el cual en estudios con ratones desnudos xenotransplantados KBM5-T315I inhibió el crecimiento de los tumores. Sin embargo también presentó citotoxicidad en médula ósea [19].

Otro ejemplo son los derivados oxidados del colesterol los llamados oxisteroles, como el epóxido de colesterol y el colestanetriol los cuales ejercen efectos mutagénico sobre el ADN tanto a nivel nuclear como mitocondrial [22].

Sin embargo otros triterpenos tales como los ácidos ursólico y oleanólico que a pesar de que inhiben el crecimiento tumoral en etapas como la iniciación y la promoción [20] no son mutagénicos. Aún más redujeron la actividad mutagénica de la doxorubicina en ratones Balb/c [21].

2.8 Actividad antiproliferativa de esteroides y triterpenos

En la literatura se encuentran un gran número de estudios que informan la inducción, en ensayos *in vitro*, de efectos antiproliferativos de triterpenos. Un ejemplo es el triterpeno tubeimosida I aislada de *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) *Fraquet*, la cual ejerce efectos citotóxicos en células HeLa a través de la activación de las rutas de disfunción mitocondrial y estrés celular [25,23]. Otro ejemplo son los triterpenos avicina D y G aislados de la especie *Acacia victoria* (Cactaceae). Éstos triterpenos inhiben el crecimiento de linfocitos humanos T mediante la regulación de proteínas como c-myc, cyclina D1, Bcl2, survivina y VEGF [23 y 24].

Por otro lado, los esteroides también ejercen efectos antiproliferativos en células de cáncer humano. Un ejemplo de ello es el lofenol y sus derivados; los cuales mostraron actividad inhibitoria del crecimiento en células HCT-15(cancer de colon), BEL-7402(cancer de hígado) y KB (cancer nasofaríngeo) [26].

En nuestro caso, en estudios previos hemos demostrado que los esteroides peniocerol y macdougallina, en el ensayo de sulforrodamida B, mostraron actividad inhibitoria del crecimiento celular en las líneas celulares HCT-15(cáncer

de colon), PC-3(cáncer de próstata), MCF-7(cancer de mama), U-251(cáncer de sistema nervioso), K-562(leucemia) a 48 horas de tratamiento [27].

2.9 Actividad citostática de esteroides y triterpenos

La detención del ciclo celular está caracterizada por una alta proporción de células encontradas en el mismo evento del ciclo celular en un determinado tiempo. Este arresto del ciclo celular puede ser resultado de la adición de un agente o compuesto anticanceroso [28]. Diversos compuestos poseen la capacidad de detener el ciclo celular en las fases G₀/G₁, S, G₂/M. Un ejemplo de esto, es la argentinina B, un triterpeno el cual indujo efectos citostáticos importantes en el rango de concentraciones entre 5 y 25 μ M [29]. Otro ejemplo es el ácido ursólico, el cual ha mostrado efectos citostáticos tempranos en G₁ en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 [30].

Por otra parte los esteroides también inducen la detención del ciclo celular. Un ejemplo de ello es el β -sitosterol, el cual posee la capacidad, en células de cáncer de mama MDA-MB-231, de detener el ciclo celular en la fase G₂/M [31]. Aún más, este mismo compuesto detuvo el ciclo celular en G₁ en las mismas células [32], lo cual parece estar mediado por el estatus de CDK4 y la ciclina D río abajo y P21/Cip1 y p27/Kip1 río arriba.

Estos resultados sugieren que los esteroides pueden inducir efectos de detención del ciclo celular de diversas formas las cuales pueden ser dependientes de múltiples factores celulares. Hoy en día aún no se conoce con suficiente profundidad la manera en la que muchos esteroides y triterpenos inducen estos efectos sobre el ciclo de la célula.

2.10 Actividad apoptótica de esteroides y triterpenos

La apoptosis es un proceso regulado que involucra la activación de una cascada de eventos moleculares que derivan en la muerte celular. Se caracteriza por la reducción de tamaño de las células así como los cambios en la distribución de la fosfatidilserina de membrana, condensación de la cromatina y degradación

de sus proteínas asociadas, formación de cuerpos apoptóticos, etc. La ruta apoptótica involucra la activación de un grupo de cistein proteasas llamadas “caspasas” y una cascada compleja de eventos que vinculan el estímulo inicial con la muerte final de la célula [33].

Muchos estudios *in vitro* han descrito el potencial pro-apoptótico de los esteroides en varios sistemas celulares. De esta manera algunos compuestos como los oxisteroides pueden incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO), inducir la modificación de las proteínas celulares y alterar varias rutas de señalización y expresión génica [34]. Sin embargo, estudios de relación estructura actividad han demostrado que los oxisteroides varían de forma importante en su habilidad para inducir apoptosis y por lo tanto no se ha propuesto un mecanismo que explique la actividad de éste tipo de compuestos.

Algunos ejemplos de esteroides con actividad apoptótica son el 7 β ,25-dihidroxicolesterol, el cual al ser evaluado en linfocitos indujo efectos proapoptóticos mediante la reducción de la actividad de PKC [35]. Otro caso son los esteroides 7-ketolesterol y 7 β -hidroxicolesterol, los cuales en las líneas celulares U937 y MCF-7 indujeron la liberación del citocromo c característico del proceso de apoptosis mitocondrial. De esta manera diferentes rutas de apoptosis pueden ser inducidas dependiendo del oxisteroides o el tipo celular [36].

Por otro lado también se ha visto que diversos triterpenos poseen la capacidad de inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer humano. Algunos de los triterpenos con mayor capacidad de inducción de estos efectos son los ácidos ursólico y oleanólico, los cuales se ha visto inducen apoptosis en células de leucemia y linfoma [37 y 38]. Otro caso de triterpenos inductores de apoptosis son la pristimerina, la cual mostró la activación de este proceso mediante la activación de caspasa 3 y 9 así como la activación de PARP y desregulación de BCL-X_L/Bax de forma dependiente de la concentración en células U87. De esta manera es importante mencionar que al igual que los esteroides los triterpenos pueden inducir la activación de apoptosis dependiendo de la estructura o tipo celular.

2.11 Actividad moduladora de NF-kB por esteroides y triterpenos

NF-kB es un factor de transcripción que regula la expresión de varios cientos de genes involucrados en muchos procesos fisiológicos y celulares, incluyendo las respuestas inmune e inflamatoria, la adhesión celular, la diferenciación, la respuesta al estrés oxidante y a la apoptosis [39]. Mas aún, la actividad de NF-kB se encuentra desregulada en una importante cantidad de enfermedades humanas, especialmente en aquellas que involucran procesos inmunes, inflamación y sobrevivencia celular. Por lo tanto la búsqueda de agentes que modifiquen la ruta de señalización de NF-kB han sido tema de fuerte interés [40]. De esta manera existen tres tipos de factores que inducen efectos inhibitorios en NF-kB; estos son inhibidores biomoleculares, los químicos sintéticos y los productos naturales [41, 42,43].

De esta última dichos inhibidores se dividen en antioxidantes, inhibidores de IKK y compuestos reactivos a tioles que pueden tener como blanco las etapas de la señalización de NF-kB [44, 45,46]. Un ejemplo donde se pone de manifiesto la inhibición de IKK el esteroide guggulsterona aislado de la especie *Commiphora mukul* en células del epitelio intestinal [47]. Dicho esteroide mostró efectos inhibitorios de la actividad de la IκB cinasa (IKK) responsable de la activación del factor nuclear κB. Otro ejemplo, lo constituye los esteroides de la especie *Ganoderma lucidum*, que también mostraron efectos inhibitorios en el proceso de traslocación, del dímero de NF-kB al núcleo, en cultivos de células neuronales [48]. Otro ejemplo como inhibidores de NF-kB a través de IKK es triterpeno pentacíclico alfa-amirina aislado de la especie *Protium kleinnii*, el cual mostró actividad inhibitoria en la degradación de IκB alfa e inhibición de la fosforilación y translocación de p65/Rel A en núcleo [49].

3. HIPÓTESIS

A pesar de que los metabolitos secundarios peniocerol, macdougallina y chichipegenina, aislados de *M. geometrizans*, no inducen efectos genotóxicos en células no cancerosas, es posible que induzcan la activación de procesos citotóxicos, citostáticos y apoptóticos en células de cáncer humano.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los mecanismo de acción de las posibles actividades citotóxicas y genotóxicas de los metabolitos secundarios peniocerol, macdougallina y chichipegenina, todos aislados de *Myrtillocactus geometrizans*

4.2 Objetivos Particulares

- Determinar el potencial genotóxico de los esteroides peniocerol, macdougallina y chichipegenina por el ensayo de micronucleos en eritrocitos de raton cepa CD1
- Determinar el potencial citotóxico de los esteroides peniocerol y macdougallina mediante el ensayo de tinción por cristal violeta
- Determinar el potencial citostático de peniocerol y macdougallina mediante el ensayo de tinción de ADN con Yoduro de Propidio.
- Determinar el potencial apoptótico de peniocerol y macdougallina mediante el ensayo de Anexina V y Yoduro de Propidio por citofluorometría
- Determinar el potencial de inducción degradativo de PARP por peniocerol y macdougallina mediante Western Blot.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Aislamiento de peniocerol, macdougallina y chichipegina

5.1.1 Colecta

Las partes aéreas y raíces de *Myrtillocactus geometrizans* se colectaron en los alrededores de los municipios de Actopan y de Ixmiquilpan Hidalgo (20°29'40"N y 99°10'02"W). El material vegetal se trasladó al laboratorio para su secado y procesamiento.



Figura 5. Zona de colecta de *Myrtillocactus geometrizans* (Fuente: Google Maps. 2015)

5.1.2 Maceración

La raíz y las partes aéreas se sometieron a un proceso de maceración, por separado, con metanol (100%) durante un periodo de 48 horas a temperatura

ambiente. La destilación del disolvente a presión reducida, mediante rotavapor, permitió la obtención de los extractos respectivos.



Raíz

Partes aéreas

Figura 6. Maceración de raíz y partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans*

5.1.3 Separación

La separación cromatográfica del extracto de metanol se realizó mediante una columna abierta empacada con sílice (CC) y eluída con mezclas de disolventes de polaridad ascendente. De esta separación se obtuvieron diversas fracciones, las cuales se combinaron con base en sus datos de cromatografía en placa fina (TLC).

5.1.4 Purificación de los compuestos presentes en el extracto metanólico

Del extracto de metanol de la raíz se obtuvieron los metabolitos peniocerol y macedougallina los cuales fueron purificados por cristalizaciones repetidas. Por otro lado la chichipegénina se obtuvo por la separación cromatográfica, de manera similar al anterior, del extracto de metanol de las partes aéreas. La evaluación de los perfiles cromatográficos se llevó a cabo mediante TLC y el revelado de las placas se realizó con sulfato cérico.

5.1.5 Identificación de los compuestos peniocerol, macdougallina y chichipegenina

La identidad de los metabolitos secundarios se llevó a cabo por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura[15,54,55]

5.2 Evaluación de la actividad genotóxica

5.2.1 Animales

Los experimentos se realizaron con ratones de la cepa CD1, los cuales fueron alimentados y mantenidos en cajas de plástico bajo condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa de (40-60%) y un fotoperiodo de (12 horas luz/12 horas oscuridad). El agua y la ración de alimento comercial (Rodent Lab chow 500®) fue dada *ad libitum*. La edad promedio de los animales fue de dos meses con un rango en peso de 20-25 gramos los cuales fueron adquiridos a través del bioterio de Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, UNAM. Los experimentos realizados fueron llevados en concordancia con las guías de buen manejo de animales de laboratorio.

5.2.2. Ensayo de micronúcleos

Se utilizaron 15 ratones macho con rango de peso entre 20-25 g por compuesto, los cuales fueron distribuidos de manera uniforme en 3 grupos. Los compuestos peniocerol, macdougallina y chichipegenina fueron disueltos en 0.3mL de aceite de maíz y administrados de forma intraperitoneal. Los animales fueron tratados como se describe: grupo 1 (control positivo) recibió 60 mg/kg de peso de Ciclofosfamida intraperitoneal (Ifoxan, Baxter Oncology Gmb; CAS:3778-73-2); grupo 2 y 3 recibieron 50 y 100 mg/kg de peso de cada compuesto respectivamente. La muestra de sangre al tiempo 0 fue considerado como el control negativo para cada dosis evaluada. Las dosis fueron seleccionadas tomando en cuenta la DL_{50} por el ensayo de Lorke en ratones de la misma cepa (Bolaños et al., dato no publicado). El ensayo fue llevado a cabo siguiendo los protocolos estándar según el protocolo propuesto por G. Krisna [50]. Las muestras

de sangre fueron tomadas de la vena caudal de cada ratón y las laminillas se hicieron por triplicado antes y durante la administración del compuesto (tiempo 0, 24, 48 y 72 horas). Las laminillas fueron marcadas con Giemsa (Sigma Diagnostics) y el radio de eritrocitos policromáticos (EPCs) en relación a los eritrocitos normocromáticos (ENCs) fue determinado en 1000 eritrocitos por ratón con el fin de evaluar la citotoxicidad y la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMNs) en 1000 eritrocitos policromáticos por ratón (EPCs) fue registrado como medida de genotoxicidad. Finalmente se utilizó el programa estadístico STATA 11 para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

5.3 Evaluación de la actividad citotóxica, citostática y apoptótica

Para determinar el potencial de inducción de apoptosis de peniocerol, macdougallina y chichipegina en primera instancia se llevaron a cabo la realización de curvas de citotoxicidad con las líneas celulares U-251, PC-3, K-562, HCT-15 y MCF-7 con cada uno de los tres compuestos. Esto se hizo con el fin de realizar las curvas dosis-respuesta a diferentes intervalos de tiempo y concentración; con el fin de identificar cual de los tres compuestos presentaba la mayor actividad. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo por la técnica de cristal violeta.

5.3.1 Ensayo de Cristal Violeta

Las células fueron sembradas en placas de 48 pozos a una densidad de 2×10^4 células por cm^2 en RPMI con rojo fenol suplementado con 10% de SFB, 2mM de L-Glutamina, 100 UI por mL de penicilina G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomina y 0.25 μg de anfotericina B. Las líneas celulares cultivadas fueron mantenidas en una atmósfera a 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37°C . Al siguiente día, concentraciones definidas de peniocerol y macdougallina (10,20,40 y 80 μM) fueron adicionadas. La viabilidad celular fue evaluada a 24 y 48 horas después del tratamiento con los compuestos. Los metabolitos secundarios fueron disueltos en DMSO para formar una solución de reserva (stock) mientras que para

el control positivo se utilizó Doxorubicina a concentraciones menores a 1 μM . El DMSO fue adicionado a los pozos control a la concentración más alta en la cual ningun efecto en el crecimiento celular ha sido observado (<1%). Después de la incubación con los compuestos, las células adheridas a los pozos fueron fijadas con 100 μL de Glutaraldehído al 1.1%(peso/vol) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente el sobrenadante fue retirado y las placas fueron lavadas con agua y se dejaron sacar al aire. Las placas fijadas fueron teñidas con 100 μL de Cristal Violeta durante 15 minutos para posteriormente ser solubilizada la proteína teñida con 200 μL de ácido acético(peso/volumen). Los valores de la densidad óptica fueron leídos en un lector de microplacas con una longitud de onda de 595 nm. Una curva dosis respuesta fue graficada para cada compuesto y le IC50 fue estimada usando el programa estadístico STATA 11 mediante una regresión lineal.

Una vez obtenidos los valores de las concentraciones medias inhibitorias, se procedió a evaluar aquellos compuestos con la mayor actividad citotóxica mediante el ensayo de ciclo celular por citofluorometría el cual se describe a continuación:

5.3.2 Ensayo de Ciclo Celular

Para llevar a cabo la determinación del ciclo celular se utilizaron las líneas celulares en las cuales los compuestos con mayor actividad. Estas fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células en platos de cultivo de 100X20 mm y se dejaron adherir durante 24 horas. Después de este tiempo las células fueron estimuladas con los compuestos más activos (Peniocerol y Macdougallina) a concentraciones de 40 y 60 μM durante 24 horas. Después de este tratamiento las células fueron colectadas con tripsina y centrifugadas por cinco minutos a 1500 rpm. Posteriormente el pellet formado en la centrifugación fue resuspendido en PBS (pH=7.4) y de nuevo centrifugado por cinco minutos a 1500 rpm. Una vez centrifugado se aspiró el sobrenadante y las células fueron fijadas con 70% de metanol a 4°C durante 24 h. Una vez pasado este tiempo, las células se volvieron a centrifugar y se eliminó el sobrenadante del Metanol y el pellet se lavó con PBS.

Una vez lavado el pellet, se vuelve a centrifugar y resuspender de nuevo en PBS para marcar el ADN con 5 µg/mL de yoduro de propidio. El análisis de ciclo celular fue hecho utilizando un citómetro FACScan y el software CELLQuest software. El perfil del ciclo celular fue obtenido analizando 10 000 eventos usando el mismo software.

Analizado el ciclo celular se procedió a evaluar el potencial de inducción de apoptosis, para lo cual se siguió la siguiente metodología:

5.3.3 Ensayo de Apoptosis con Anexina V y IP

Para medir apoptosis en las líneas celulares seleccionadas, se utilizó el ensayo de apoptosis por citofluorimetría utilizando los marcadores de muerte apoptótica Anexina V y IP. Este ensayo fue utilizado debido a que tiene la capacidad de medir la cantidad de células en apoptosis por medio de la unión de la Anexina V con la fosfatidilserina expuesta en la superficie celular de las células mientras que el Yoduro de propidio se une al material genético de las células que se encuentran en este proceso. De esta manera 2×10^6 células en 7 mL de medio fueron sembradas en cajas Petri grandes y se dejaron durante 24 para que se adhirieran dichas células a la caja. Después de este proceso las células fueron tratadas con 40 y 60 µM de peniocerol y la misma proporción de macdougallina en células HCT-15 y MCF-7. Al final del tratamiento, las células adherentes y no adherentes fueron colectadas y lavadas dos veces con PBS para ser resuspendidas en la solución de marcado que contiene 10 milimolar de HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 milimolar de NaCl, 5 milimolar de CaCl_2 , 20 µl del reactivo de Annexina-V-Fluos (Roche) y 20 µl de la solución de Yoduro de Propidio (concentración de 50 µg/mL). Una vez marcadas las células con la solución, estas fueron incubadas durante 15 minutos en oscuridad para posteriormente ser leídas en el citómetro FACScan usando el software CELLQuest. El perfil del ciclo celular fue obtenido analizando 10 000 eventos mediante el uso de gráficas de puntos (dot plots) de la dispersión frontal de luz (FSC) contra la dispersión lateral (SSC) para posteriormente relacionar los parámetros FL1-H (Fluorescencia verde)

contra FL2- H(Fluorescencia roja). Con base a estos resultados se identificaron eventos de tipo apoptótico así como eventos de tipo necrótico celulares.

Finalmente, como una prueba comprobatoria del potencial apoptótico de los compuestos evaluados en apoptosis y en ciclo celular, se evaluó la fragmentación de PARP(Poli-ADP-Ribosa Polimerasa) debido a que es uno de los eventos indicativos de muerte apoptótica tardía. Para llevar a cabo dicha evaluación se utilizó el análisis del Western Blot con el fin de identificar los patrones de fragmentación de dicha proteína, el cual se describe a continuación:

5.3.4 Ensayo de Western Blot

Las células HCT-15 y MCF-7 fueron tratadas con 40 μ M de peniocerol y la misma proporción de Macdougallina durante 12, 24 y 36 h para posteriormente ser lisadas en un buffer que contiene 50mM de HEPES(pH 7.4), 1mM de EDTA, 250 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 10 mM NaF, 1 mM de vanadato de sodio y una mezcla inhibidora de proteasas. Treinta microgramos de proteína fueron corridos en un gel de SDS-PAGE y posteriormente transferidos a una membrana PVDF. La membrana fue incubada con 5% de leche descremada deshidratada para bloquear las uniones proteínicas no específicas para después incubarse con los anticuerpos primarios a temperatura ambiente durante toda la noche. Los anticuerpos humanos para PARP-1, α -tubulina y β -actina fueron utilizados como anticuerpos primarios. Los anticuerpos secundarios (anti-ratón) fueron utilizados como anticuerpos secundarios. La quimioluminiscencia fue visualizada por medio de la exposición a una película marca Kodak.

5.4 Análisis estadísticos

Todos los resultados fueron analizados y presentados como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas fueron determinadas usando la "t" de student con la ayuda del software estadístico STATA 11 (versión 11.1). Todas las comparaciones fueron hechas con relación a los controles no tratados. Una diferencia estadística fue considerada a * $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de Peniocerol, Macdougallina y Chichipegenina

La raíz y partes aéreas de *Myrtillocactus geometrizans*, fueron colectadas en el estado de Hidalgo dentro de los municipios de Ixmiquilpan y Actopan durante el periodo de verano del 2008 y 2009. Cada una de las partes fue extraída por separado con metanol. A partir del extracto metanólico de raíz se llevó a cabo la separación por columna cromatografica de la cual se obtuvieron 169 fracciones. De estas fracciones se obtuvieron diversos precipitados, dentro de los que se encontró que uno de estos mostraba el mismo factor de corrimiento (rf) que el informado para peniocerol. De esta manera por cristalización se obtuvo el compuesto puro, el cual fue caracterizado por técnicas espectroscópicas y espectrométricas (IR, RMN¹H, RMN ¹³C, EM y Difracción de Rayos X, etc.) (ANEXOS).

Los resultados de los análisis espectroscópicos de este compuesto mostraron IR, ν_{\max} 3375, 2951, 2869,1465,1376,1129,1048 cm^{-1} . ¹H RMN (CDCl₃ 300 MHz) δ 0.60 (3H,s, H-18), 0.86 (3H,d,J=6.5 Hz, H-26), 0.87 (3H, d, J=6.5Hz, H-27), 0.88 (2H,m,H2-23), 0.91 (3H,d,J=6.5 Hz,H-26), 0.87 (3H, d, J=6.5Hz, H-27), 0.88 (2H,m,H2-23), 0.91 (3H,d,J=6.6 Hz,H-21), 0.95 (2H,m,H2-22), 0.97(3H,s,H-19), 1.10(2H,m,H2-24), 1.12 (2H,m,H2-12), 1.39(1H,m,H-20), 1.14 (1H,m,H-17),1.29 (2H,m,H2-16),1.32 (2H,m,H2-12), 1.39 (1H,m,H-5), 1.48 (1H,m,H-25), .69 (2H,m,H2-1), 1.83(2H,m,H2-2), 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,H2-7), 3.61 (1H,m,H-3), 3.72 (1H,m,H-6). ¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ 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 los datos físicos y espectroscópicos permitió identificar a este compuesto como peniocerol, según los valores

reportados en la literatura por Djerassi *et al* [55]. De manera adicional se obtuvo dicho compuesto con la pureza suficiente para su análisis por difracción de rayos x (Figura 4), el cual hasta el momento no se ha informado en la literatura.

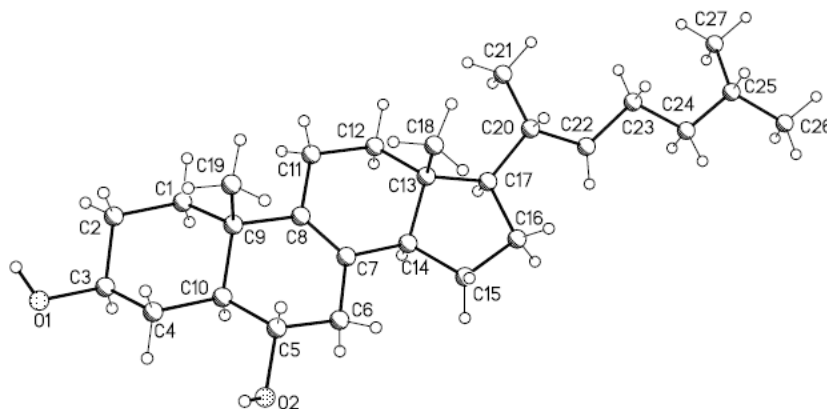


Figura 7. Estructura del cristal de peniocerol obtenida por difracción de rayos X.

Por otro lado al llevar a cabo la cristalización lenta de las aguas madre de peniocerol, se obtuvo un sólido blanco amorfo con un punto de fusión de 122-124 °C. Los resultados de los análisis espectroscópicos de este compuesto mostraron IR, ν_{\max} 3375, 2951, 2869, 1465, 1376, 1129, 1048 cm^{-1} . ^1H RMN δ 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,H2-23), 1.21 (1H,m,H-4a), 1.22 (2H,m,H2-22), 1.26 (1H,m,H-7b), 1.30 (2H,m,H2-16), 1.32 (1H,m,H-5), 1.33 (1H,m,H-22), 1.4 (2H,m,H2-12), 1.46 (1H,m,H-2a), 1.66 (1H,m,H-15a), 1.68 (2H,m,H2-1), 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,H2-11), 2.09 (1H,m,H-17), 2.16 (1H,m,H-4^a), 2.22 (1H,m,H-4b), 2.39 (2H,m,H2-24), 3.61 (1H,m,H-3), 3.8 (1H,m,H-6). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 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 los datos

físicos y espectroscópicos permitió identificar a este compuesto como Macdougallina, según los valores reportados en la literatura por Djerassi *et al* [54].

Posterior al aislamiento anterior, se llevó a cabo el aislamiento de un triterpeno a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta colectada. Una vez obtenido dicho extracto se procedió con la separación por cromatografía en columna de la cual se obtuvieron 136 fracciones y una serie de precipitados de color blanco y amarillo. De estos, los obtenidos en la polaridad Hexano: Acetato de Etilo (8:2) fueron combinados con base a la TLC y mediante cristalizaciones sucesivas con hexano se obtuvo un precipitado blanco el cual mostró un punto de fusión de 278-280° C. Dicho precipitado se analizó por medio de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas; presentando los siguientes datos: IR, ν_{\max} 3610, 3370, 1650, 1290, 1260, 1190, 1160, 1100, 1060, 1040, 1005, 925 cm^{-1} . ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ 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-1^a), 0.99 (3H,s,H-23), 1.00(3H,s,H-26), 1.05 (1H,m,H-19), 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,H₂-2), 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,H₂-11), 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, H₂-28), 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). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ 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-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^+], 438 (50), 248 (28), 217(100), 199 (45), 173 (28). De esta manera la comparación de los datos físicos y espectroscópicos permitió identificar a este compuesto como chichipegenina, según los valores reportados en la literatura por Djerassi *et al* [3].

Compuesto	Peniocerol	Macdougallina	Chichipegenina
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	C ₃₀ H ₅₀ O ₄
Peso molecular	402.64 g/mol	416.6 g/mol	474.6 g/mol
Rendimiento	0.09 %	0.07 %	0.06%
Punto de fusión	160-165°C	170-174°C	278-280°C

Tabla 2. Características de los compuestos aislados de *M. geometrizans*

6.2 Evaluación de la actividad genotóxica de Peniocerol, Macdougallina y Chichipegenina

Se evaluó la actividad genotóxica de los compuestos peniocerol, macdougallina y chichipegenina en sangre periférica de ratones de la cepa CD-1 mediante el ensayo de micronucleos. El análisis de los promedios de las frecuencias de micronúcleos de cada uno de los tres compuestos, se encuentran en las tablas 2, 3 y 4.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo			
		0	24	48	72
Peniocerol	0	3.0±1.0	3.3±0.33	3.3±0.33	3.3±0.33
	50	3.6±0.57	3.6±0.88	3.6±0.33	3.0±0.57
	100	3.6±0.57	4.6±1.85	4.0±0.01	4.0±0.02
Ciclofosfamida	60	3.6±0.57	5.3±0.57*	5.3±0.057*	6.0±1.15*

Tabla 3. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados intraperitonealmente con Peniocerol(n=3). Los datos se presentan como el promedio ± desviación estándar. Los valores marcados con (*) indican diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo ($p > 0.05$)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo			
		0	24	48	72
Macdougallina	0	3.3±0.57	3.6±0.57	3.6±0.57	3.3±1.52
	50	3.6±0.57	3.6±0.57	4.3±0.57	3.3±0.57
	100	3.6±0.57	4.0±1.73	3.6±0.57	3.6±0.57
Ciclofosfamida	60	3.6±0.57	5.3±0.57*	5.3±0.0.57*	6.0±1.15*

Tabla 4. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados intraperitonealmente con Macdougallina (n=3). Los datos se presentan como el promedio ± desviación estándar. Los valores marcados con (*) indican diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo (p>0.05)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo			
		0	24	48	72
Chichipegenina	0	3.6±0.57	3.3±0.57	4.0±0.01	4.0±0.10
	50	4.0±1.0	3.6±0.57	4.3±0.0.57	3.6±0.57
	100	4.3±0.57	4.0±1.0	4.3±0.01	4.0±1.0
Ciclofosfamida	60	3.6±0.57	5.3±0.57*	5.3±0.0.57*	6.0±1.15*

Tabla 5. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados intraperitonealmente con Chichipegenina (n=3). Los datos se presentan como el promedio ± desviación estándar. Los valores marcados con (*) indican diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo (p>0.05)

Como se puede observar en las tablas 2,3 y 4, ninguno de los compuestos de prueba indujo un incremento en la frecuencia de micronucleos en los eritrocitos de sangre periférica. Esto indica que ninguno de ellos es capaz de provocar daño directo al ADN al menos por eventos de tipo clastogénicos ni aneugénicos.

6.3 Evaluación de la actividad citotóxica, citostática y apoptótica

6.3.1 Evaluación de la actividad citotóxica

Para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos peniocerol, macdougallina y chichipegenina se llevó a cabo la obtención de curvas concentración respuesta a 24 y 48 horas en algunas de las líneas celulares donde los compuestos peniocerol y macdougallina habían presentado importante actividad en el ensayo de Sulforodamida evaluadas previamente por nuestro grupo (HCT-15 y MCF-7) (Tabla 5 y 6)

Línea celular	24h	48h
HCT-15	41 _± 2	28 _± 6
MCF-7	48 _± 4	21 _± 4
Doxorrubicina	3 _± 3	2 _± 2

Tabla 6. Actividad de inhibición del crecimiento celular (IC_{50}) 24 y 48 horas después del tratamiento con peniocerol. Los valores presentados son el promedio de 3 experimentos independientes hechos por triplicado cada uno \pm D.E.

Línea celular	24h	48h
HCT-15	37 _± 5	33 _± 4
MCF-7	31 _± 3	28 _± 5
Doxorrubicina	4 _± 3	3 _± 2

Tabla 7. Actividad de inhibición del crecimiento celular (IC_{50}) a 24 y 48 horas después del tratamiento con macdougallina. Los valores presentados son el promedio de 3 experimentos independientes hechos por triplicado cada uno \pm D.E.

Los resultados mostraron que peniocerol y macdougallina inducen efectos de disminución de la viabilidad celular, los cuales fueron mayores en la línea celular HCT-15 en el caso de peniocerol y en MCF-7 en el caso de macdougallina a las 24 horas. Sin embargo a las 48 horas solamente peniocerol mostró mayor actividad en la línea celular MCF-7, lo cual puede explicarse en parte por las diferencias en el tiempo de crecimiento celular de ambas líneas.

Por otro lado los resultados del tratamiento con chichipegénina en las líneas celulares HCT-15 y MCF-7 no mostró ningún efecto de disminución del crecimiento celular; por lo que se decidió solamente hacer la evaluación con peniocerol y macdougallina en los ensayos de detención del ciclo celular y de apoptosis.

6.3.2 Evaluación de la actividad citostática

Para evaluar la actividad citostática se llevó a cabo un análisis de la distribución del ciclo celular después del tratamiento durante 24 horas con peniocerol y macdougallina a la concentración de 40 μM y 60 μM de ambos compuestos (Tabla 7 y Figura 5)

Compuesto	Fase del Ciclo Celular (%)					
	HCT-15			MCF-7		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
<i>Control (DMSO)</i>						
24 h	52 _± 8	20 _± 3	28 _± 4	59 _± 7	16 _± 4	25 _± 6
<i>Penicicero</i>						
40 µM	79 _± 12*	12 _± 4*	9 _± 6*	75 _± 10*	9 _± 5*	16 _± 4*
60 µM	84 _± 7*	7 _± 4*	9 _± 6*	78 _± 7*	7 _± 4*	15 _± 7*
<i>Macdougallin</i>						
40 µM	71 _± 7*	9 _± 2*	20 _± 7	79 _± 9*	12 _± 3	9 _± 5*
60 µM	67 _± 10*	11 _± 2*	22 _± 10	80 _± 8*	10 _± 2	9 _± 3*
<i>Timidina</i>						
2mM	79 _± 7*	14 _± 4	7 _± 5*	70 _± 9*	17 _± 6*	13 _± 6*
<i>Nocodazol</i>						
100ng/mL	7 _± 4*	13 _± 7	82 _± 9*	4 _± 1*	4 _± 1*	92 _± 10*

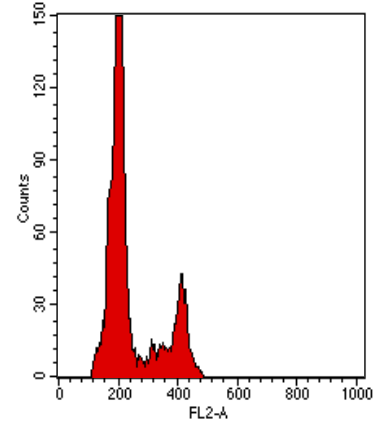
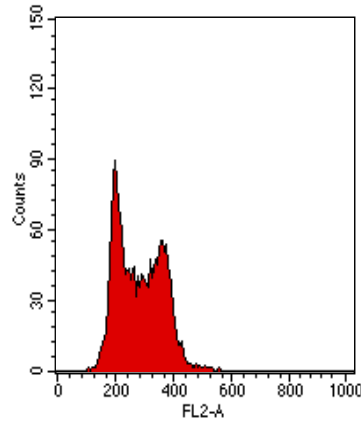
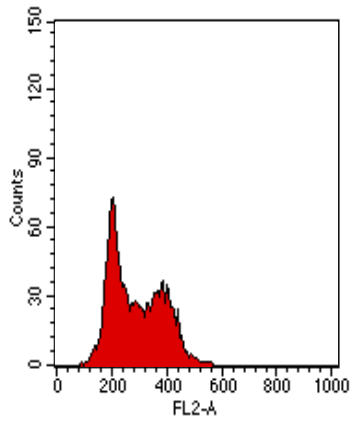
Tabla 8. Efectos de Penicicero y macdougallina sobre la distribución del ciclo celular en las células HCT-15 y MCF-7. Los valores fueron expresados como la media+ D.E. de tres experimentos independientes hechos en triplicado cada uno. Las células no tratadas fueron usadas como control.(*).Significancia estadística con relación al grupo no tratado($p < 0.05$)

HCT-15

Control

Peniocerol 40 μ M

Peniocerol 60 μ M



Macdougallina 40 μ M

Macdougallina 60 μ M

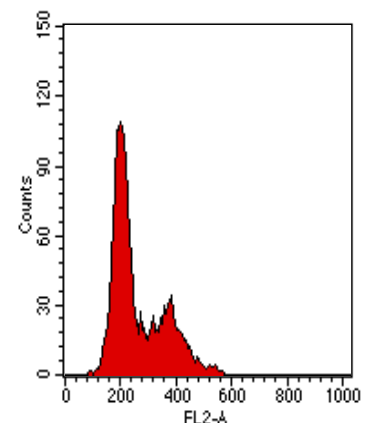
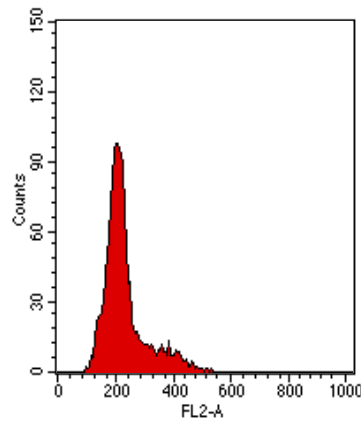


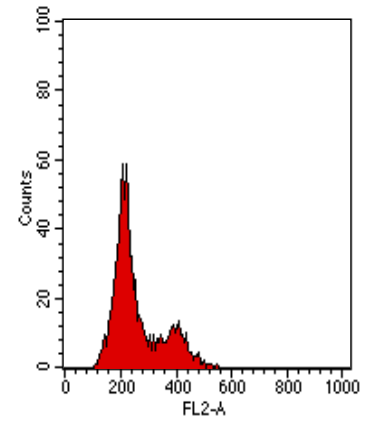
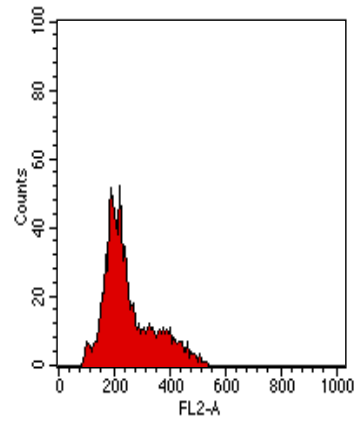
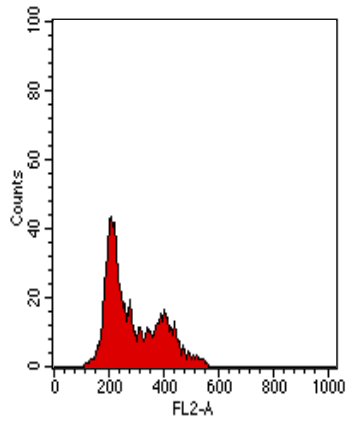
Figura 8. Efectos sobre la distribución del ciclo celular inducidos por Peniocerol y Macdougallina sobre HCT-15 a 24 h.

MCF-7

Control

Peniocerol 40 μ M

Peniocerol 60 μ M



Macdougallina 40 μ M

Macdougallina 60 μ M

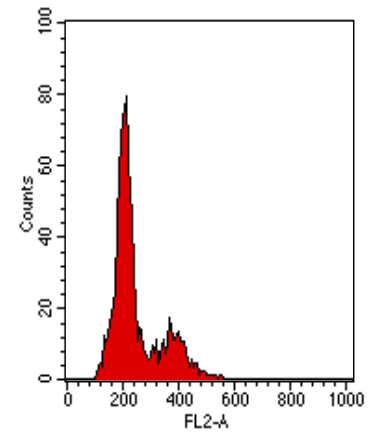
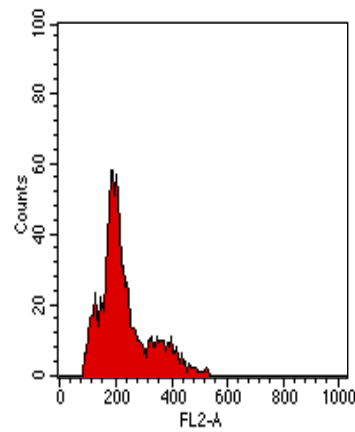


Figura 9. Efectos sobre la distribución del ciclo celular inducidos por Peniocerol y Macdougallina sobre MCF-7 a 24 h.

Los resultados de este experimento mostraron que peniocerol y macdougallina inducen un incremento en el porcentaje de células en la fase G₀/G₁ en ambas líneas celulares el cual es estadísticamente diferente al control no tratado. Sin embargo aunque fueron utilizadas dos concentraciones diferentes ninguna diferencia significativa fue encontrada entre ambas después del tratamiento con cada uno de los compuestos en ambas líneas celulares. Esto puede indicar que el efecto inducido por los compuestos sobre cada una de las fases del ciclo celular no depende de la dosis.

6.3.3 Evaluación de la actividad apoptótica

Para evaluar si el efecto citostático se encontraba relacionado con eventos de tipo apoptótico las células HCT-15 fueron incubadas con Peniocerol y Macdougallina a 40 μM durante 24 horas (Tabla 8 y Figura 6).

Tratamiento	Porcentaje de Apoptosis (%)
A. Control, HCT-15	90 ± 1 % (-A/-IP)
	7 ± 3 % (+A/-IP)
B. Peniocerol 40μM	48 ± 5 % (-A/-IP)
	52 ± 5 % (+A/-IP)
C. Macdougallin 40μM	22 ± 2% (-A/-IP)
	73 ± 5 % (+A/-IP)

Tabla 9. Porcentaje de apoptosis inducida por Peniocerol o Macdougallina en células HCT-15 a 24 h. (-A/-IP) Anexina V negativa/Yoduro de Propidio negativo, (+A/-IP) Anexina V positiva/Yoduro de Propidio negativo. Los valores representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por triplicado (n=9)

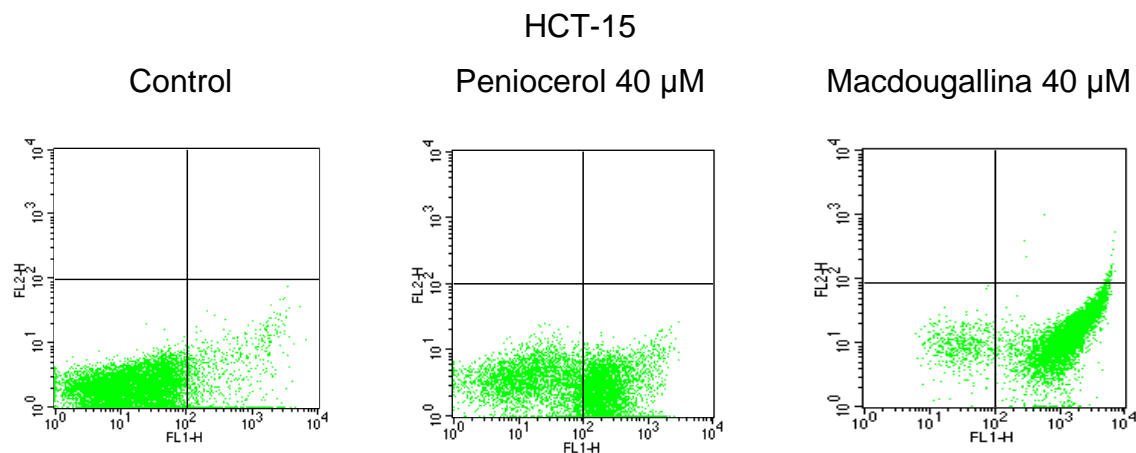


Figura 10. Graficas representativas de puntos (dot plots) de las células HCT-15 tratadas con Peniocerol y Macdougallina a 40 μ M. El cuadrante inferior izquierdo representa las células (-A/-IP) Anexina V negativa/Yoduro de Propidio negativo(viables), el cuadrante inferior derecho (+A/-IP) Anexina V positiva /Yoduro de Propidio negativo (apoptosis temprana), el cuadrante superior derecho (-A/+IP) Anexina V negativa /Yoduro de Propidio positivo (apoptosis tardía) y el cuadrante superior izquierdo (+A/+IP) Anexina V positiva /Yoduro de Propidio positivo (necrosis).

Sin embargo para el caso de la línea celular MCF-7, se observó previamente que a 24 h las células no mostraban ningún cambio morfológico visible en el microscopio; se decidió hacer la evaluación a 48 horas.(Tabla 9 y Figura 7).

Tratamiento	Porcentaje de Apoptosis (%)
D. Control, MCF-7	88 ± 3% (-A/-IP) 11 ± 3 % (+A/-IP)
E. Peniocerol 40µM	16 ± 2 % (-A/-IP) 83 ± 2 % (+A/-IP)
F. Macdougallin 40µM	33 ± 3 % (-A/-IP) 66 ± 3 % (+A/-IP)

Tabla 10. Porcentaje de apoptosis inducida por Peniocerol o Macdougallina en células MCF-7 a 48 h.(-A/-IP) Anexina V negativa/Yoduro de Propidio negativo, (+A/-IP) Anexina V positiva/Yoduro de Propidio negativo. Los valores representan la media \pm Desviación Estándar de tres experimentos independientes hechos por triplicado (n=9)

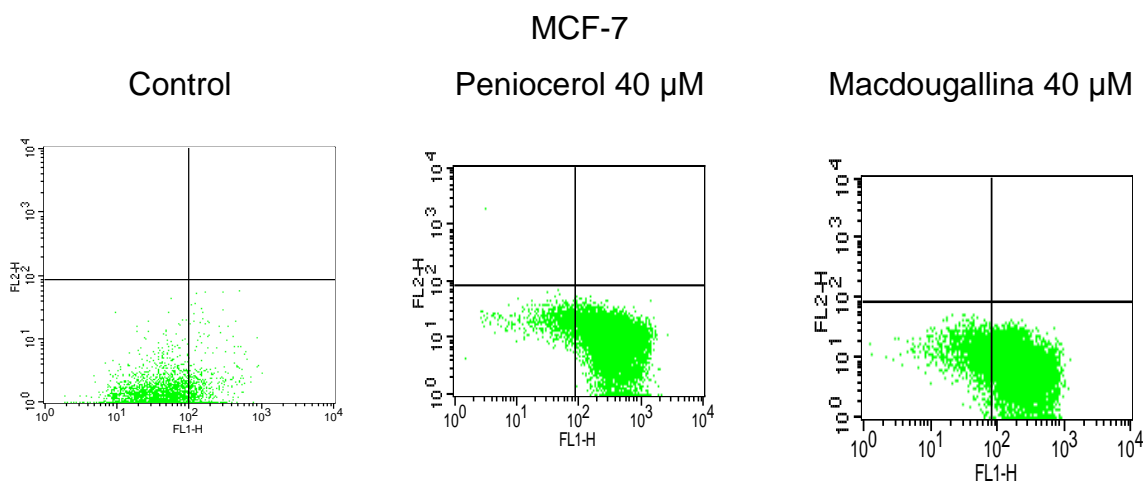


Figura 11. Graficas representativas de puntos (dot plots) de las células MCF-7 tratadas con Peniocerol y Macdougallina a 40 µM. El cuadrante inferior izquierdo representa las células (-A/-IP) Anexina V negativa/Yoduro de Propidio negativo(viables), el cuadrante inferior derecho (+A/-IP) Anexina V positiva /Yoduro de Propidio negativo (apoptosis temprana), el cuadrante superior derecho (-A/+IP) Anexina V negativa /Yoduro de Propidio positivo (apoptosis tardía) y el cuadrante superior izquierdo (+A/+IP) Anexina V positiva /Yoduro de Propidio positivo (necrosis).

Los resultados de este experimento mostraron que los compuestos peniocerol y macdougallina presentan inducción de apoptosis a las mismas concentraciones y tiempos evaluados. Sin embargo en dichas actividades existe diferencias importantes en la capacidad de macdougallina en relación a peniocerol, el cual es 1.4 veces mayor en su capacidad de inducción de apoptosis en la línea celular HCT-15 mientras que en la línea celular MCF-7 peniocerol presentó 1.2 veces más capacidad de inducción de apoptosis que macdougallina. Este fenomeno es de gran interés ya que entre los dos compuestos solo existe una diferencia estructural que es la presencia de un metilo(CH₃), el cual puede estar participando en las diferencias de actividad biológica entre los dos.

6.3.4 Evaluación de la activación de PARP(Poli-ADP-Ribosa-Polimerasa)

Con el fin de llevar a cabo una prueba confirmatoria para identificar si el mecanismo de inducción de apoptosis concluye hasta sus fases finales, se llevó a cabo la determinación de corte de PARP mediante western blot a 12, 24,36 h en la línea celular HCT-15(Figura 8)

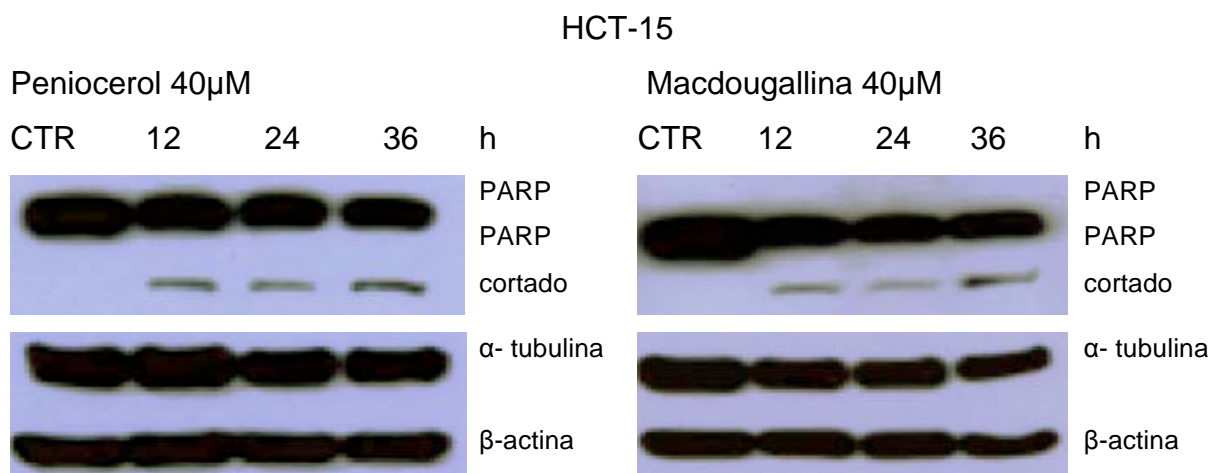


Figura 12. Western Blots de las células HCT-15 tratadas con Peniocerol y Macdougallina durante 12,24 y 36 h.

Asi mismo se llevó a cabo corte de PARP mediante western blot a 12, 24,36 h en la línea celular MCF-7 (Figura 9)

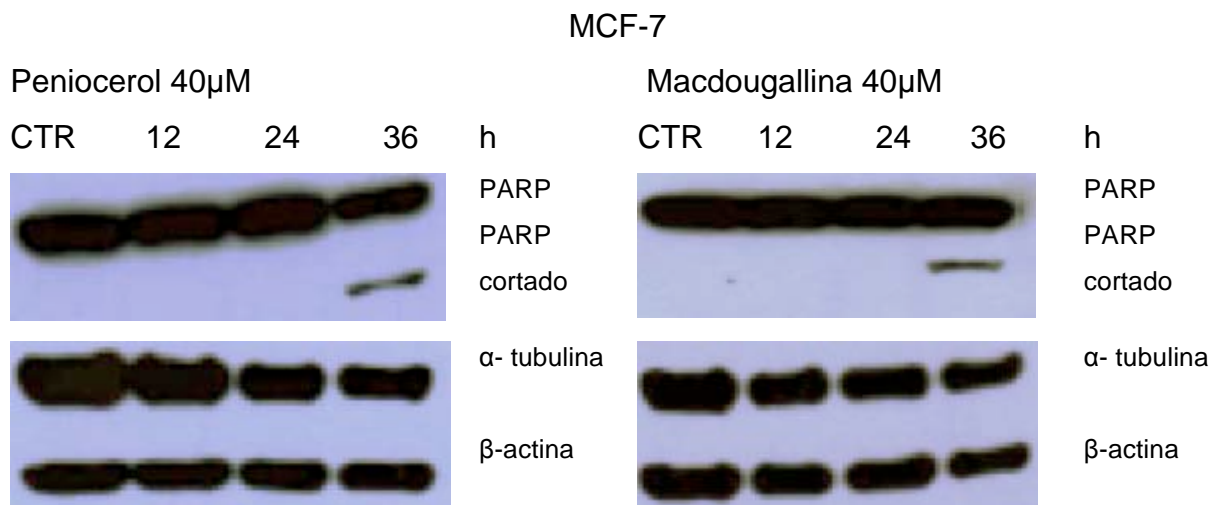


Figura 13. Western Blots de las células MCF-7 tratadas con Peniocerol y Macedougallina durante 12,24 y 36 h.

Los resultados de este experimento mostraron que tanto peniocerol como macedougallina tienen la capacidad de inducir corte de PARP a la concentración de 40 μM en ambas líneas celulares característica del proceso de apoptosis tardía. Dicha actividad presenta un comportamiento dependiente del tiempo en la línea celular HCT-15, mientras que en la línea celular MCF-7 solo se observa la aparición de esta fragmentación hasta las 36 h. Este fenómeno puede explicarse en parte por las diferencias de susceptibilidad entre las dos líneas celulares, la cual es más evidente en las células HCT-15 ya que ambos compuestos presentan similitudes en los patrones de fragmentación en las líneas evaluadas.

7. DISCUSIÓN

La apoptosis juega un papel importante en mantener la homeostasis de los tejidos mediante la eliminación selectiva de células no viables o por exceso de ellas. Hoy en día, se conoce que fármacos utilizados en la clínica como el eteposido, cisplatino y paclitaxel inducen apoptosis en las células cancerosas. Tomando en cuenta lo anterior se ha reconocido que la apoptosis de las células cancerosas es un mecanismo importante en el tratamiento del cáncer.

En los años recientes, varios estudios realizados *in vitro* han demostrado que los efectos citotóxicos de varios esteroides son mediados por apoptosis. De acuerdo con estas observaciones nuestros resultados de experimentos de doble tinción con Anexina V y Yoduro de propidio indican que también el peniocerol y la macdougalina inducen la muerte celular mediante apoptosis.

Por otro lado, es conocido que la enzima PARP es un sustrato para ciertas caspasas las cuales se activan en las etapas tempranas de la apoptosis, por lo tanto la detección de fragmentos de PARP sirve como marcador de procesos de apoptosis. Nuestros resultados mostraron que los esteroides peniocerol y macdougalina inducen la fragmentación de PARP en las líneas celulares HCT-15 y MCF-7. Éstos resultados indican claramente que los esteroides peniocerol y macdougalina inducen la muerte celular por vía de la apoptosis.

Adicionalmente tanto el peniocerol como la macdougalina inducen un arresto, en las fases G₀/G₁, del ciclo celular en las líneas HCT-15 y MCF-7. Este resultado sugiere que estos metabolitos secundarios podrían ser útiles contra el crecimiento celular del cáncer.

Cabe señalar que la única diferencia estructural entre el peniocerol y la macdougalina es que ésta última presenta un metilo en C-14. Sin embargo, dado que estos dos esteroides presentan las mismas actividades biológicas entonces la presencia de un metilo en C-14 en la estructura de la macdougalina no es relevante para sus actividades biológicas.

Varios estudios han demostrado que los llamados fitoesteroles promueven la apoptosis, así se ha demostrado que el β -sitosterol a una dosis de 16 μ M incrementó la apoptosis en células de cáncer de prostata. De manera similar el mismo efecto se ha observado en células de leucemia tratadas con diferentes concentraciones de β -sitosterol durante 72 horas.

También se ha demostrado que el incremento de la actividad de la caspasa 3 es el mecanismo por el cual el β -sitosterol promueve la apoptosis. Aunque no mostramos el mecanismo exacto en que el peniocerol y la macedougalina inducen la apoptosis, existe la posibilidad de que estos esteroides actúen bajo el mismo mecanismo que el β -sitosterol.

Dado que la mayoría de los fármacos citotóxicos hoy utilizados en la clínica son genotóxicos sería adecuado que se encontrara que no lo fuese. Nuestros resultados de la administración del peniocerol y macedougalina por separado a ratones de la cepa CD1 a las dosis y tiempos evaluados produjeron frecuencias de Eritrocitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) las cuales no fueron significativas con los rangos basales del control (1-4 por cada 1000 EPC). Estos resultados indicaron que estos tres metabolitos secundarios no presentan evidencia de genotoxicidad ya que no incrementaron la frecuencia de EPCMN a ninguna de las dosis evaluadas. Futuras investigaciones en las cuales se utilicen otros métodos de detección de sustancias genotóxicas es posible que revelen el potencial inocuo de dichos compuestos.

Tomando en cuenta todo lo anterior es posible concluir que peniocerol y macedougallina emergen como buenos candidatos para ser desarrollados para obtener agentes antiproliferativos más efectivos en la terapia contra el cáncer.

8. CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos se puede determinar lo siguiente:

- Los metabolitos secundarios peniocerol, macdougallina y chichipegenina fueron ser aislados de la especie *Myrtillocactus geometrizans* con rendimientos de hasta 0.09% (peniocerol)
- Estos metabolitos secundarios no presentan evidencia de producir alteraciones al material genético de la célula al menos por daños de tipo aneugénico y clastogénico
- Los esteroides Peniocerol y Macdougallina inducen efectos antiproliferativos en las líneas celulares HCT-15 y MCF-7 mientras que chichipegenina no presento ningún efecto en ninguno de los ensayos de citotoxicidad
- El efecto antiproliferativo de peniocerol y macdougallina esta relacionado con la detención del ciclo celular principalmente en la etapa G1.
- Posterior a la detención del ciclo celular los compuestos peniocerol y macdougallina inducen la activación del proceso de apoptosis, el cual comienza con la aparición de marcadores de muerte temprana de Anexina V +/IP- para terminar con la fragmentación de PARP característico de la muerte celular apoptótica tardía
- Los experimentos realizados en la presente tesis son la base para la realización de futuros experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*, los cuales también servirán para el desarrollo de futuros tratamientos en los que existan desórdenes en la proliferación celular.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] **Salazar Juan Rodrigo**. 2011. Determinación del mecanismo anti-inflamatorio de peniocerol y chichipegenina aislados de *Myrtillocactus geometrizans*. Tesis Profesional. UNAM
- [2] **Batis, A.I., Rojas-Aréchiga,M.** 2002. El peyote y otros cactus Alucinógenos de México. *Biodiversitas* **40**:12-17
- [3] **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
- [4] **Bravo-Hollis,H.** 1978. **Las cactáceas de México**. Vol.I. Universidad Nacional Autónoma de México.Ciudad de México.México.
- [5] **Anderson,E.F.** 2001. The Cactus Family. Timber Press,Portland,Oregon,USA
- [6] **Guzmán, U., Arias, S., Dávila, P.** 2007. Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae:Magnolipsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala,UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México.
- [7] **Casas, A.** 2002. Uso y manejo de Cactáceas Columnares Mesoamericanas. *Biodiversitas* **40**:18-22
- [8] **Granados- Sánchez, D., Hernández-García, M.A., López-Rios, G.F.** 2004. Estudio integral del valle de Tehuacán-Cuicatlán: recursos genéticos de plantas. En: Chávez-Servia, J.L., Tuxill y D.I. Jarvis(eds). Manejo de la diversidad de los cultivos en los agroecosistemas tradicionales. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia.
- [9] **Paredes,F.M., Lira,S.R., Dávila,A.P.** 2007. Estudio Etnobotánico de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Acta Botánica Mexicana.* **79**:13-61

- [10] **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
- [11] **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
- [12] **Guzmán-Maldonado 2010, S.H., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D., Reynoso-Camacho,R., Guzman-Tovar, A., Vaillant, F.,Brat, P.** 2010. Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two undeutilised fruit cactus species(*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food Chemistry* **121**: 381-386
- [13] **Luna-Morales,C.C.,Aguirre R.R.** 2001. Clasificación tradicional, Aprovechamiento y Distribución Ecológica de la Pitaya Mixteca en México. *Interciencia* **26**:18-24.
- [14] **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
- [15] **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
- [16] **Ferguson R.L. y Pearson E.A.** 1996. The clinical use of the mutagenic anticancer drugs. *Mutation Research.* **355**,1-12
- [17] **Maier P. y Schmid W.** 1976. Ten model mutagens evaluated by the micronucleous test. *Mutation Research.* **40**, 325-338
- [18] **Tinwell H y Ashby H.J.** 1994. Genetic toxicity and potential carcinogenicity of taxol. *Carcinogenesis.* **15(8)**, 1499-1501
- [19] **Zhongzheng Lu, Yanli Jin, Chun Chen, Juan Li, Qi Cao and Jingxuan Pan.** Pristimerin induces apoptosis in imatinib-resistant chronic myeleogenous

leukemia cells harboring T315I mutation by blocking NF- κ B signaling and depleting Bcr-Abl. *Molecular Cancer* 2010, **9**:112

[20] **Oguro T, Liu J, Klaassen C D, Yoshisa T.** 1998. Inhibitory effect of oleanolic acid on 12-O.tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced gene expression in mouse skin. *Toxicol Sci* **45**:88-93

[21] **Flávia Aparecida Resende, Claudete Aparecida Mattos de Andrade Barcala, Marcia Cristina da Silva Faria, Fabiana Hibary Kato, Wilson Roberto Cunha, Denise Crispim Tavares.** 2006 Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. *Life sciences* **79** (13): 1268-1273

[22] **Cheng YW, Kang J J, Shih Y L, Lo Y L, Wang C F.** Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation. *Food Chem Toxicol* 2005, **43**:617-622

[23] **Haridas V, Higuchi M, Jayatilake G S, et. al.** Isolation and structures of avicins D and G: in vitro tumor-inhibitory saponins derived from *Acacia victoriae*. *J Nat Prod* 2003: **66**: 779-83

[24] **Haridas V, Nishimura G, Xu ZX, et al.** Avicin D: a protein reactive plant isoprenoid dephosphorylates Stat 3 by regulating both kinase and phosphatase activities. *PloS ONE* 2009;4:e5578

[25] **Yu LJ, Ma RD, Wang YQ et al.** Potent anti-tumorigenic effect of tubeimoside 1 isolated from the bulb of *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) Fraquet. *Int J Cancer* 1992; **50**: 635-8

[26] **Lan He, Yumei Liu, Jiangong, Qiang Pei.** Synthesis and antitumor activity of cholest-4 α -methyl-7-en-3 β -ol derivatives. *Steroids* 2006 **71**:476-483

- [27] **Juan Rodrigo Salazar, Mariano Martínez Vázquez, Carlos L. Céspedes, Teresa Ramírez-Apan, Antonio Nieto-Camacho, Juan rodriguez-Silverio y Francisco Flores-Murrieta.** Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activities of Chichipegenin, Peniocerol and Macdougallin Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart.ex.Pfeiff.) Con. *Z. Naturforsch* 2010 **65**: 1-7
- [28] **Planchais, S., Glab, N., Inzé, D., Bergouunioux,C.** Chemical inhibitors: atool for a plant cell cycle studies. *FEBS Letters*. 2000. 476: 78-83
- [29] **Hortensia Parra-Delgado, Fátima García-Pillado, Monserrat Sordo, Teresa Ramírez-Apan, Mariano Martínez-Vázquez, Patricia Ostrosky-Wegman.** Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of Argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sciences* 2005 **77**:2855-2865
- [30] **Es-Saagy D, Simon A, Jayat-Vignoles C, Chulia A J, Delage C.** MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer Research* 1996. **16**: 481-486.
- [31] **Awad A B, Williams H, Fink C S.** Phytosterols reduce in vitro metastasic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr Cancer* 2001. **40**(2): 157-64
- [32] **Shanthi Sri Vundru, Raosaheb K Kale and Rana P, Singh.** β -sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013, **13**:280
- [33] **Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicology Pathology* 2007;**35**:495-516
- [34] **Wang DQ, Afdhal NH.** Good cholesterol, bad cholesterol: role of oxysterols in biliary tract diseases. *Gastroenterology* 2001:**121**:216-8

[35] **Moog C, Deloulme C, Baudier J, Revel MO, Bischoff P, Hietter H, et al.** Membrane-related oxysterol function: preliminary results on the modification of protein kinase C activity and substrate phosphorylation by 7 β ,25-dihydroxycholesterol. *Biochimie* 1991;73:1321–6.

[36] **Prunet C, Lemaire-Ewing S, Ménétrier F, Néel D, Lizard G.** Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7 β -hydroxycholesterol-induced cell death: a morphologica

[37] **Pan D, Qin J, Farber C, O'Brien J, Filippa D, Portlock CS.** CHOP with high dose cyclophosphamide consolidation versus CHOP alone as initial therapy for advanced stage, indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2003 44:967–971

[38] **Visani G, Guiducci B, D'Adamo F, Mele A, Nicolini G, Leopardi G, Sparaventi G, Barulli S, Malerba L, Isidori A, Malagola M, Piccaluga PP.** Cyclophosphamide, pegylated liposomal doxorubicin, vincristine and prednisone (CDOP) plus rituximab is effective and well tolerated in poor performance status elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005. 46:477–479

[39] **www. nf-kb.org.** Fecha de Consulta: 25 de Noviembre de 2014

[40] **Thomas D. Gilmore and Michael R. Garbati.** Inhibition of NF-kB Signaling as Strategy in Disease Therapy. *In: Currente Topics in Microbiology and Immunology. Volume 349. 2011. pp.245*

[41] **Folmer F, Jaspars DM, Diederich M.** Marine natural products as targeted modulators of the transcription factor NF-kB. *Biochem Pharmacol* 2008 75:603–617

[42] **Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB** .Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr Opin Pharmacol* (2007) 7:344–351

[43] **Ríos JL, Recio MC, Escandell JM, Andújar I**. Inhibition of transcription factors by plantderived compounds and their implications in inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 15:1212–1237(2009)

[44]**Edwards MR, Bartlett NW, Clarke D, Birrell M, Belvisi M, Johnston SL** Targeting the NF- κ B pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther* 121:1–13 (2009)

[45]**Karin M, Yamamoto Y, Wang QM** The IKK NF- κ B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3:17–26(2004)

[46] **Lee DF, Hung MC** Advances in targeting IKK and IKK-related kinases for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 14:5656–5662 (2008)

[47] **Jae Hee Cheon, Joo Sung Kim, Jung Mogg Kim,0 Nayoung Kim, Hyun Chae Jung, Sung Song**. Plant Sterol Guggulsterone Inhibits Nuclear Factor- κ B Signaling in Intestinal Epithelial Cells by Blocking I κ B Kinase and Ameliorates Acute Murine Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:1152–1161(2006).

[48] **Hong-Bo Zhao, Sai-Zhen Wang, Qi-Hhua He, Lan Yuan, Alex F. Chen, Zhi-Bin Lin**. Ganoderma total sterol (GS) and GS1 protect rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *Life Sciences* 76 (2005) 1027–1037(2005)

- [49] **Rodrigo Medeiros, Michel F. Otuki, Maria Cristina W. Avellar, Joao B. Calixto.** Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology* 559 (2007) 227–235
- [50] **G. Krisna.M. Hayashi.G.** *In vivo* rodent micronucleus assay protocol; conduct and data interpretation. *Mutation Research* 455 (2000) 229-234
- [51] **Y.H. Choi, K. R. Kong, Y. A. Kim, K. O. Jung, J. H. Kil, S. H. Rhee, and K. Y. Park.** Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol mediated apoptosis in human colon cancer cells," *International Journal of Oncology*, vol. 23, no. 6, pp. 1657-1662, 2003
- [52] **Carlos L. Céspedes, J. Rodrigo Salazar, Mariano Martínez , Eduardo Aranda.** Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry* 66 (2005) 2481-2493
- [53] **Dalla Via Lisa, N. García-Argaez Aida, Martínez Vázquez Mariano, Grancara Silvia, Martinis Pamela, Toninello Antonio.** Mitochondrial Permeability Transition as a Target of Anticancer Drugs. *Current Pharmaceutical Design*. Volume 20, Number 2, January 2014, pp.223-244(22).
- [54] **Carl Djerassi, J.C. Knight, D.I. Wilkinson.** The Structure of the Cactus Sterol Macdougallin (14 α -Methyl-Cholestene-3 β ,6 α -diol) A Novel Link in Sterol Biogenesis. *J.Am.Chem.Soc.*, 1963, 85 (6), pp 835-835
- [55] **Carl Djerassi, RHD Murray, R. Villoti.** The structure of the cactus sterol, Peniocerol (cholest-8-ene-3 β ,6 α -diol). *Journal of American Chemical Society*. 1965. 1160-1165

ANEXOS

Research Article

Effect of Sterols Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* on Growth Inhibition of Colon and Breast Cancer Cells

Mario Augusto Bolaños-Carrillo,¹ Jose Luis Ventura-Gallegos,²
Arturo David Saldivar-Jiménez,² Alejandro Zentella-Dehesa,^{2,3}
and Mariano Martínez-Vázquez¹

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510M éxico, DF, Mexico

²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510M éxico, DF, Mexico

³Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, 14080M éxico, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Mariano Martínez-Vázquez; oscar.martinezvazquez@gmail.com

Received 6 January 2015; Revised 27 March 2015; Accepted 31 March 2015

Academic Editor: Kuzhuvilil B. Harikumar

Copyright © 2015 Mario Augusto Bolaños-Carrillo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Objective. To explore the effect of peniocerol and macedougallin on HCT-15 and MCF-7 cells proliferation, cell cycle, apoptosis, and PARP cleavage. **Methods.** HCT-15 and MCF-7 cells were treated with various concentrations of peniocerol and macedougallin (10–80 μ M) during 24 or 48 h. Crystal Violet Assay was used to evaluate the inhibition effect. Cell cycle regulation was examined by a propidium iodide method. Cell apoptosis was detected through both Annexin-V FLUOS/PI double-labeled cytometry assays and Western blot was applied to assess PARP cleavage. **Results.** Peniocerol and macedougallin induced growth inhibition and apoptosis *in vitro* in a time- and dose-dependent manner. Moreover, peniocerol and macedougallin induced arrest of cell cycle-dependent manner and increased the proportion of cells in G₀/G₁ phase. PARP cleavage in HCT-15 and MCF-7 cells was induced by treatment with peniocerol and macedougallin after 36 hours. **Conclusions.** Our results showed that the mechanism of cytotoxicity displayed by peniocerol and macedougallin is related to cell cycle arrest and apoptosis in both cell lines. This is a significant observation because it helps to understand the way some oxysterols isolated from *Myrtillocactus geometrizans* develop their biological activities against cancer cells.

1. Introduction

Cholesterol (1), the main sterol in animals, has been associated with atherosclerosis, while the phytosterols, sterols synthesized by plants, have been proven to reduce serum cholesterol levels, decreasing cardiovascular risk [1]. The most abundant phytosterols are β -sitosterol (2) and campesterol; stigmasterol and brassicasterol are less common. Cholesterol and phytosterols both have a steroid nucleus and a hydroxyl at C-3. However, due to the presence of a double bond between C-5 and C-6, sterols can undergo oxidative processes [2]. In contrast, plant stanols do not have this double bond and are unlikely to oxidize. Nevertheless, the only structural difference between cholesterol and phytosterols resides in the side chain located in C-17. Compared to cholesterol, phytosterols have different substitutions in C-24 [2]. These

structural differences could account for their quite different biological activities. The oxidation of the C5–C6 double bond, or of those in other positions in the steroid ring or side chain of sterols, results in the formation of oxysterols or sterol oxidation products (SOPs). In the case of cholesterol oxidation, the resulting products are usually named COPs (cholesterol oxidation products) and, when phytosterols are oxidized, the resulting products are named POPs (phytosterol oxidation products). COPs are now thought to be potentially involved in the initiation and progression of major chronic diseases including atherosclerosis, neurodegenerative processes, diabetes, kidney failure, and ethanol intoxication [3, 4]. Even though POPs have been associated with atherosclerosis diseases and cytotoxic effects, this has only been found at concentrations [5, 6]. Due to the ability of phytosterol compounds to reduce plasma serum cholesterol levels in

humans, their addition to foods has increased significantly over the past decade [7]. However, there is some concern as these compounds showed cytotoxic activity towards normal cells.

On the other hand, there are numerous references about the phytosterols cytotoxicity activities against several human cancer cells [8, 9]. For example, it has been reported that **2** inhibited the MDA-MB-231 cell growth by 70% compared with control and induced cell cycle arrest at the G2/M phase. In contrast, cholesterol treatment to the same cells increased cellular migration [10].

In another study, the dietary effect of phytosterols versus cholesterol on the growth and metastasis of the MCF-7 human cancer cells in SCID mice was evaluated. The results showed that animals fed with phytosterols diet had tumors 40–43% smaller than those fed with the cholesterol diet [11]. However, in a recent study, it was shown that the intake of phytosterols accelerated intestinal tumorigenesis in Apc^{Min} mice; this effect was stronger in female mice [12].

Peniocerol (**3**) is a sterol isolated from *Myrtillocactus geometrizans*. Unlike the structure of **2**, peniocerol has the same lateral chain at C-17 as cholesterol; however, it has an alcohol group at C-6 and a double bond in C-8/C-9, while cholesterol has a double bond at C-5/C-6. Beyond these differences, both structures are identical. The absence of a double bond at C-5/C-6 prevents the oxidation of **3** as common in cholesterol, although the presence of an alcohol group at C-6 would indicate a degree of oxidation. Despite its structural similarity to cholesterol, we have shown the anti-inflammatory and antiproliferative properties of **3**; such activities are more common to phytosterols than to cholesterol [13].

Furthermore, as a result of a previous study about the activity of **3** on mitochondria, we postulated that the cytotoxic activity of this sterol could be attributable to the oxidation of critical thiols located on adenine nucleotide translocase, the protein mainly involved in permeability transition pores (PTP). This event in the presence of Ca²⁺ induces the mitochondrial permeability transition (MPT) with the release of the proapoptotic factors cytochrome c and apoptosis-inducing factor (AIF). These observations evidence that peniocerol may trigger both the caspase-dependent and caspase-independent apoptotic pathways [14].

In order to provide data to support the proposal on apoptosis induced by peniocerol (**3**), we decided to evaluate the cytotoxic activity and determine the cell death type as well as the probable disruption of the cell cycle by **3** in the HCT-15 and MCF-7 human cancer lines.

The sterol macdougallin (**4**) is also isolated from *M. geometrizans*. It is significant that the only structural difference between **3** and **4** is the presence of α -methyl group at C-14 in the latter. Therefore, in order to find if this small structural difference could account for its biological activities, we decided to also evaluate **4**.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals. All antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Crystal Violet reagent,

RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), Annexin V-FLUOS Staining kit, Propidium Iodide (PI), and RNase A were purchased from Roche (Manheim, Germany).

2.2. Extraction and Isolation. Peniocerol, (3 β , 6 α -diol-cholest-8-ene) and Macdougallin (14 α -methyl-3 β , 6 α -diol-cholest-8-ene) were isolated from *Myrtillocactus geometrizans* and purified as previously described [13]. Copies of the original spectra are obtainable from the author.

2.3. Cell Lines and Cell Culture. Colon adenocarcinoma (HCT-15) and breast adenocarcinoma (MCF-7) were obtained from ATCC. Medium contained 10% fetal bovine serum, penicillin 100 IU/mL, and streptomycin 100 g/mL, RPMI, at 37°C, 5% CO₂, and water saturated humidity condition. Every 1 or 2 days, for a fluid passage, the logarithm growth period of cell activity of more than 95% cells was used in this study.

2.4. Cytotoxic Assay (Crystal Violet Assay). The cytotoxicity assays were performed by seeding cells in 48-well plates at density of 2×10^4 cells/cm² in RPMI phenol red supplemented with 10% FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 IU mL⁻¹ Penicillin G, 100 μ g mL⁻¹ streptomycin sulfate, and 0.25 of μ g mL⁻¹ amphotericin B. The cell line cultures were maintained in a 5% CO₂ and 95% humidity atmosphere at 37°C. The next day, a defined concentration of peniocerol or macdougallin was added. Cell viability was evaluated 24 and 48 h after treatment by Crystal Violet Assay. Test substances were dissolved in DMSO to create a stock solution and Doxorubicin was used as a positive control. DMSO was added to control wells at the highest concentration used and no effect in cell growth was observed (<1%). After incubation with test compounds was over, adherent cell cultures were fixed by adding 100 μ L of Glutaraldehyde 1.1% (wt/vol) and incubated at room temperature for 15 minutes. The supernatant was discarded and the plates were washed with water and left to dry in the air. The fixed cells were stained with 100 μ L of Crystal Violet dye and the protein-bonded dye was solubilized with 200 μ L of 10% acetic acid (wt/vol). The values of optical density were read on a microplate reader (Elx808; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) with a test wavelength of 595 nm. A dose-response curve was plotted for each compound, and the IC₅₀ was estimated from nonlinear regression using STATA 11 software (version 11.1; Stata Corporation, College Station, TX, USA).

2.5. Cell Cycle Assay. HCT-15 and MCF-7 cells were cultured to a density of 1×10^6 cells in 100 \times 20 mm culture petri dishes. After a 24 h period, cells were cultured in the presence of peniocerol and macdougallin at 40 μ M and 60 μ M concentrations during 24 hours. Thymidine and Nocodazole were used as positive controls. After these treatment cells were harvested and centrifuged for five minutes at 1500 rpm, the pellet was resuspended in PBS (pH = 7.4) and centrifuged again for five minutes at 1500 rpm. Cells were fixed with 70% of methanol at 4°C for at least 24 h. Methanol was eliminated by centrifugation and the pellet was washed with PBS. DNA

TABLE 1: Cytotoxicity (IC₅₀) of peniocerol and macdougallin in HCT-15 and MCF-7 cancer cells.

Compound	Human cancer cell lines	IC ₅₀ value (μ M)	Incubation time (hour)
Peniocerol	HCT-15	41.66 \pm 0.41	24
		28.85 \pm 0.60	48
	MCF-7	48.17 \pm 0.35	24
		21.77 \pm 0.39	48
Macdougallin	HCT-15	37.67 \pm 0.76	24
		33.71 \pm 0.84	48
	MCF-7	31.83 \pm 1.06	24
		28.15 \pm 0.54	48
Doxorubicin (DOX)	HCT-15	0.36 \pm 0.03	24
		0.16 \pm 0.02	48
	MCF-7	0.37 \pm 0.02	24
		0.28 \pm 0.01	48

*HCT-15: colorectal adenocarcinoma. MCF-7: breast adenocarcinoma.

*Values are expressed as mean \pm S.D of three independent experiments, each made in triplicate.

was labeled with 5 μ g/mL⁻¹ Propidium Iodide (PI) solution. Cell cycle analysis was made using a FACScan cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and CELLQuest software (BD Biosciences). The cell cycle profile was obtained by analyzing 10,000 events using the FlowJo software version 7.2.5 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA).

2.6. Annexin V-FITC Apoptosis Assay. Annexin V-FLUOS (Roche) and Propidium Iodide were used to measure apoptosis according to manufacturer's protocol. This assay measures the apoptotic cells by binding phosphatidylserine exposed on the cytoplasmic surface of the cell membrane of apoptotic cells. On the other hand, Propidium Iodide (PI) is a membrane impermeant dye that is generally excluded from viable cells. It binds to double stranded DNA by intercalating between base pairs of death cells. PI is excited at 488 nm and is emitted at a maximum wavelength of 617 nm. Briefly, 2×10^6 HCT-15 cells were plated to each well plate. After 24 h, cells were treated with either DMSO alone at the highest concentration used as control, 40 μ M or 60 μ M of peniocerol, or 40 μ M or 60 μ M of macdougallin, respectively. At the end of the treatment, adherent and nonadherent cells were harvested and washed twice with PBS and then resuspended with 0.1 mL⁻¹ of Annexin-binding buffer. Cells were incubated in the dark during 15 minutes at room temperature. After incubation, the samples were analyzed with FACScan flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA) using CELLQuest Software (BD Biosciences). The percentage of apoptotic cells in the cell samples was obtained by analyzing 10,000 events using the FlowJo software version 7.2.5 (Tree Star Inc, Ashland, OR, USA).

2.7. Western Blot Analysis. Cells were treated with 40 μ M of peniocerol or macdougallin, respectively, for 12, 24, and 36 h and lysed in buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10 mM NaF, 1 mM sodium vanadate, and protease cocktail inhibitor (complete, EDTA-free, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Thirty

micrograms of protein was run in SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore Corp., Bedford, MA). The membranes were incubated with 5% dehydrated skim milk to block nonspecific protein bindings and then incubated with primary antibodies at room temperature overnight. The primary anti-human PARP-1, α -tubulin, and β -actin antibodies were used. Anti-rabbit antibodies were used as secondary antibodies. The blots were revealed using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL). The chemiluminescence was visualized by exposing to film (Kodak, Rochester, NY).

2.8. Statistical Analysis of Biological Assays. Each experiment was observed in triplicate. The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical differences were determined using Student's *t*-test and the STATA 11 software (version 11.1; StataCorp, College Station, TX, USA). All comparisons are made relative to untreated controls. A statistical difference was considered at **P* < 0.05.

3. Results

3.1. Effects of Peniocerol and Macdougallin on Viability of HCT-15 and MCF-7 Cells. Cytotoxic effect of peniocerol (3) and macdougallin (4) was tested against HCT-15 and MCF-7 cells using the crystal violet colorimetric method. Doxorubicin was used as a positive control. HCT-15 and MCF-7 cells were exposed to 10–80 μ M concentrations range of 3 or 4 for 24 or 48 h. Bioactivity of 3 and 4 was determined on the concentration that induced 50% inhibition on the growth of the treated cells as compared to the controls. The results are showed in Table 1.

3.2. Annexin V/Propidium Iodide Assay. The HCT-15 cells were incubated with peniocerol (3) or macdougallin (4) at 40 and 60 μ M concentration during 24 h. As expected, apoptosis was sterol concentration dependent (Figure 1). The

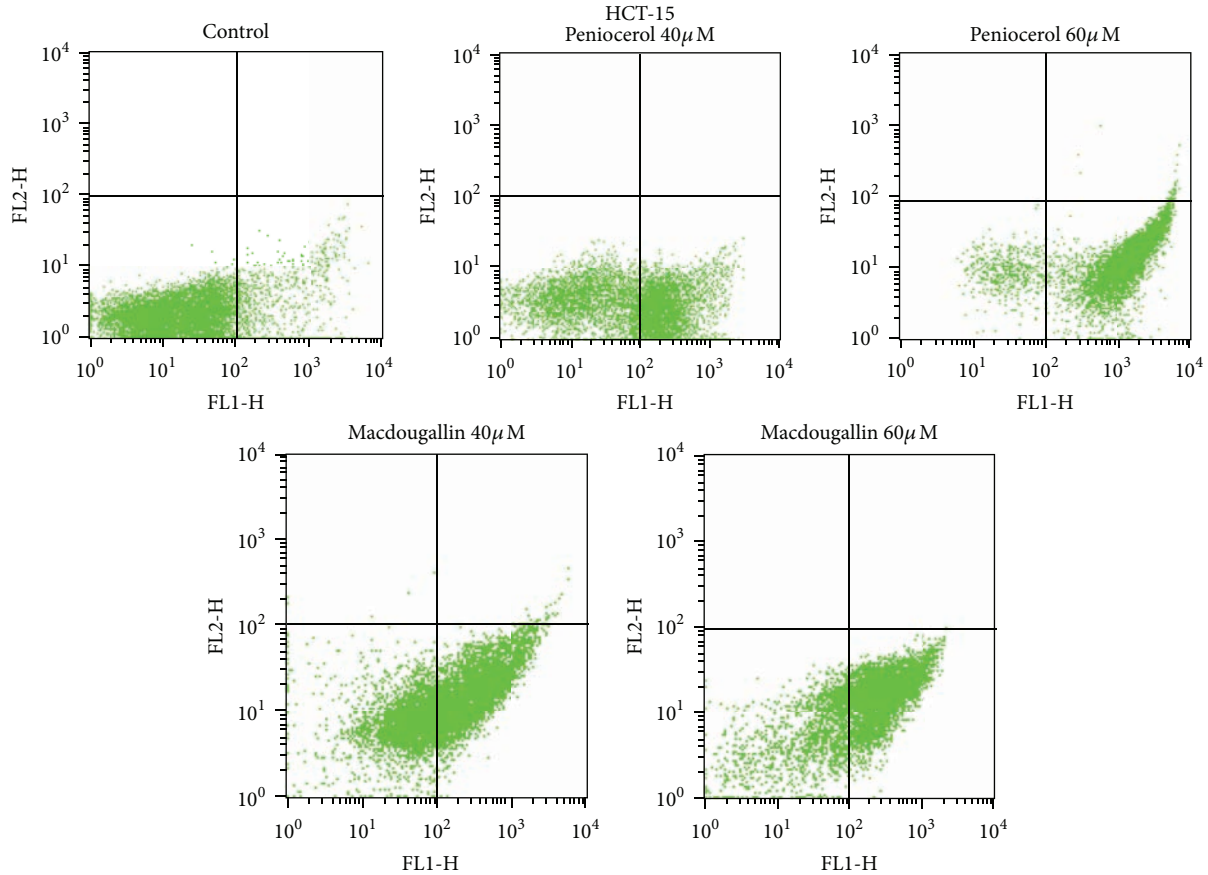


FIGURE 1: Annexin V/PI assay. HCT-15 cells treated with penicercerol (3) or macdougallin (4) at 40 and 60 μM concentrations. Values are expressed as mean + S.D. of three independent experiments, each made in triplicate.

TABLE 2: Percentage of apoptosis induced by penicercerol or macdougallin in HCT-15 cell line.

Treatment	Percentage of apoptosis (%)
(A) Control, HCT-15, 24h	7.14 \pm 1.13% (EA)
	0.24 \pm 0.11% (LA)
(B) Penicercerol 40 μM , 24h	51.96 \pm 5.54% (EA)
	0.11 \pm 0.06% (LA)
(C) Penicercerol 60 μM , 24h	73.36 \pm 4.20% (EA)
	14.60 \pm 2.53% (LA)
(D) Macdougallin 40 μM , 24h	63.30 \pm 0.42% (EA)
	1.39 \pm 0.22% (LA)
(E) Macdougallin 60 μM , 24h	77.63 \pm 2.81% (EA)
	0.04 \pm 0.05% (LA)

EA: early apoptosis, LA: late apoptosis.

Values are expressed as mean + S.D. of three independent experiments, each made in triplicate.

percentages of apoptosis induced by 3 or 4 in HCT-15 cell line are shown in Table2 .

On the other hand, the MCF-7 cells were incubated with penicercerol (3) or macdougallin (4) at 40 μM concentration

TABLE 3: Percentage of apoptosis induced by penicercerol or macdougallin in MCF-7 cell line.

Treatment	Percentage of apoptosis (%)
(A) Control, MCF-7, 48h	11 \pm 3% (EA)
	0.36 \pm 0.15 (LA)
(B) Penicercerol 40 μM , 48h	83 \pm 2% (EA)
	0.23 \pm 0.12 (LA)
(C) Macdougallin 40 μM , 48h	66 \pm 3% (EA)
	1.27 \pm 6% (LA)

EA: early apoptosis, LA: late apoptosis.

Values are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments, each performed in triplicate ($n = 9$).

during 48 h (Figure2) . The percentages of apoptosis induced by 3 or 4 in MCF-7 cell line are shown in Table3 .

3.3. Cell Cycle Analysis. The HCT-15 and MCF-7 cell cycle distribution changed compared with the control group when they were treated with penicercerol (3) or macdougallin (4) (Table4) . An increase of 3 or 4 concentration leads to an increase of the percentage of G_0/G_1 phase cells in both cell lines. For example, in HCT-15 cells at 40 μM concentration of

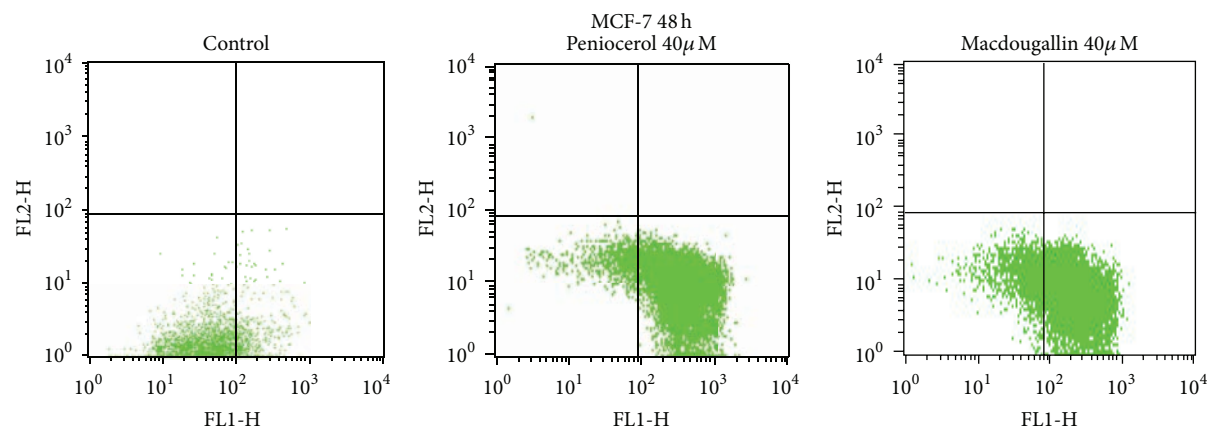


FIGURE 2: Annexin V/PI assay. MCF-7 cells treated with penicercerol and macedougallin at 48 h (40 μ M each one).

TABLE 4: Effects of penicercerol and macedougallin on cell cycle distribution.

Compound	Cell cycle phase (%)					
	HCT-15		MCF-7			
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
Control (DMSO)						
24 h	49.82 \pm 0.61	22.05 \pm 0.14	28.72 \pm 0.40	59.6 \pm 0.78	15.61 \pm 0.86	25.22 \pm 0.36
Penicercerol (1)						
40 μ M	80.63 \pm 0.61*	13.92 \pm 0.85*	5.56 \pm 0.22*	75.29 \pm 1.65*	8.93 \pm 1.05*	16.10 \pm 0.80*
60 μ M	84.13 \pm 2.30 ^a	6.39 \pm 4.21 ^a	5.84 \pm 3.49*	78.49 \pm 0.70 ^a	6.53 \pm 0.08 ^a	15.19 \pm 0.72*
Macedougallin (2)						
40 μ M	64.17 \pm 5.39*	10.89 \pm 0.79*	25.22 \pm 4.60*	78.34 \pm 1.28*	12.49 \pm 1.19*	9.55 \pm 1.49*
60 μ M	68.61 \pm 2.65*	7.93 \pm 0.12 ^a	23.16 \pm 2.62*	80.28 \pm 1.04*	10.49 \pm 0.59 ^a	9.44 \pm 0.57*
Timidine						
2 mM	82.18 \pm 1.09	13.84 \pm 1.76	4.45 \pm 1.94	70.16 \pm 1.50	17.34 \pm 0.67	13.05 \pm 1.24
Nocodazol						
100 ng/mL	9.2 \pm 0.85	17.59 \pm 1.59	73.63 \pm 2.51	3.90 \pm 0.92	3.95 \pm 1.80	92.21 \pm 1.54

Values are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments, each made in triplicate. Untreated cells were used as a control. *Significant difference with untreated group ($P < 0.05$). ^aSignificant difference with treated group at 24 h ($P < 0.05$).

penicercerol the percentage of G_0/G_1 was 80.63 \pm 0.61, while, at 60 μ M, it was 84.13 \pm 2.30. A very similar effect was shown in the MCF-7 cell line (Table 4). Conversely, in HCT-15 cells, the S phase percentage was reduced as consequence of penicercerol treatment; at 40 μ M concentration, the percentage was 13.92 \pm 0.85%, while, at 60 μ M concentration, it was 6.39 \pm 4%. The same effect was seen in MCF-7. In general, 3 and 4 induced HCT-15 and MCF-7 cell cycle arrest that occurs mainly in G_0/G_1 phase (Figure 3).

3.4. Penicercerol (3) and Macedougallin (4) Induced Cleavage of PARP in HCT-15 and MCF-7 Cells. To further validate apoptotic effect of 3 and 4 on the HCT-15 and MCF-7 cells, we examined the PARP cleavage by Western blotting assay after treatment at 12, 24, and 36 h. The concentrations used were

40 μ M for both sterols. The results showed that, in the HCT-15 cells, the PARP cleavage is time-dependent (Figure 4). These results suggest that penicercerol and macedougallin have similar ability to induce PARP cleavage.

4. Discussion

Both penicercerol and macedougallin have been shown to inhibit the proliferation of U-251, PC-3, K-562, HCT-15, and MCF-7 human cancer lines [13]. Using HCT-15 and MCF-7 cells in this paper we showed that cell death induced by 3 and 4 is by apoptosis.

Apoptosis plays an important role in the maintenance of tissue homeostasis by the selective elimination of excess cells. Furthermore, apoptosis induction of cancer cells is also recognized to be useful in cancer treatment, since some

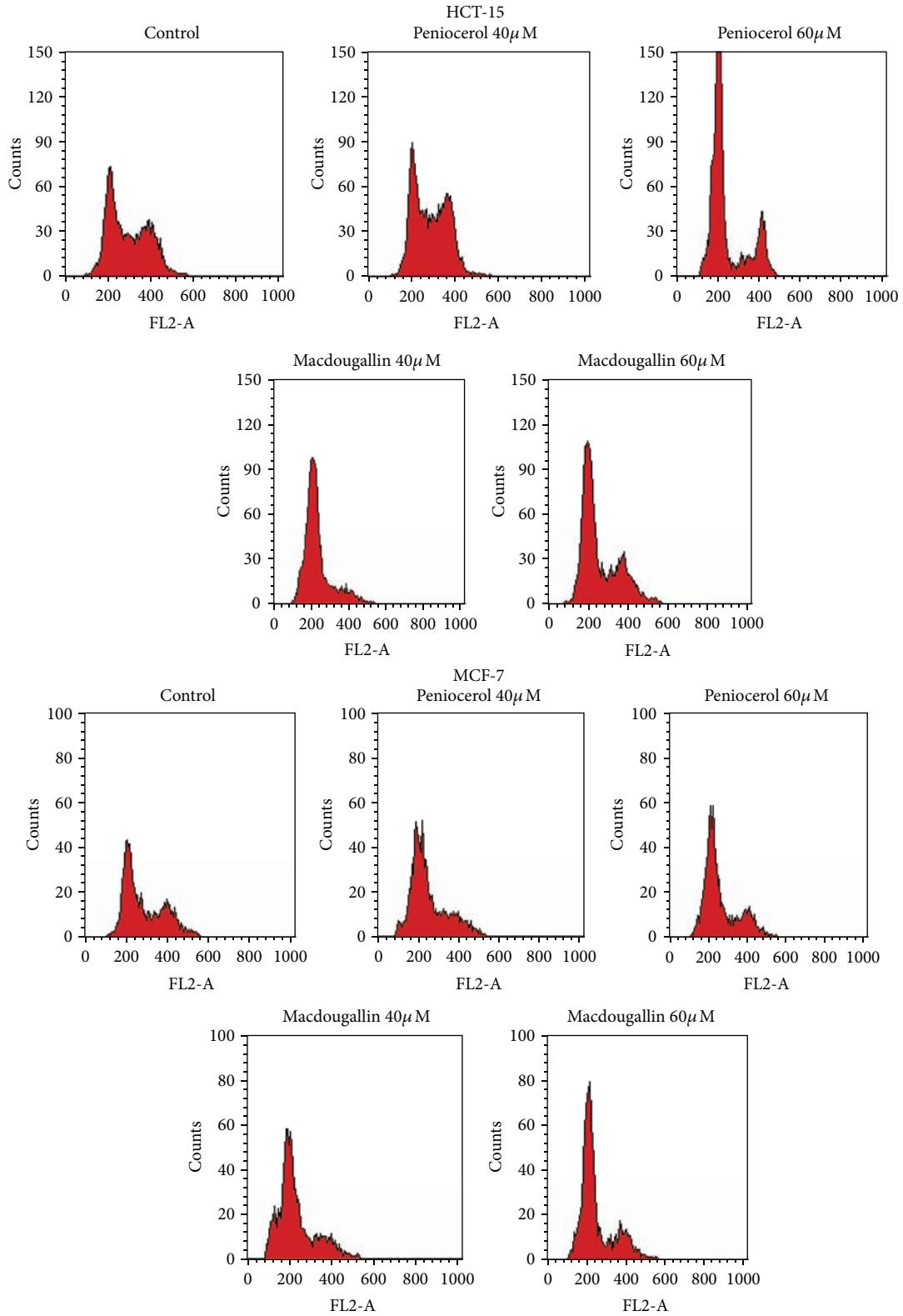


FIGURE 3: Effects of penicercerol and macdougallin on HCT-15 and MCF-7 cell cycle distribution.

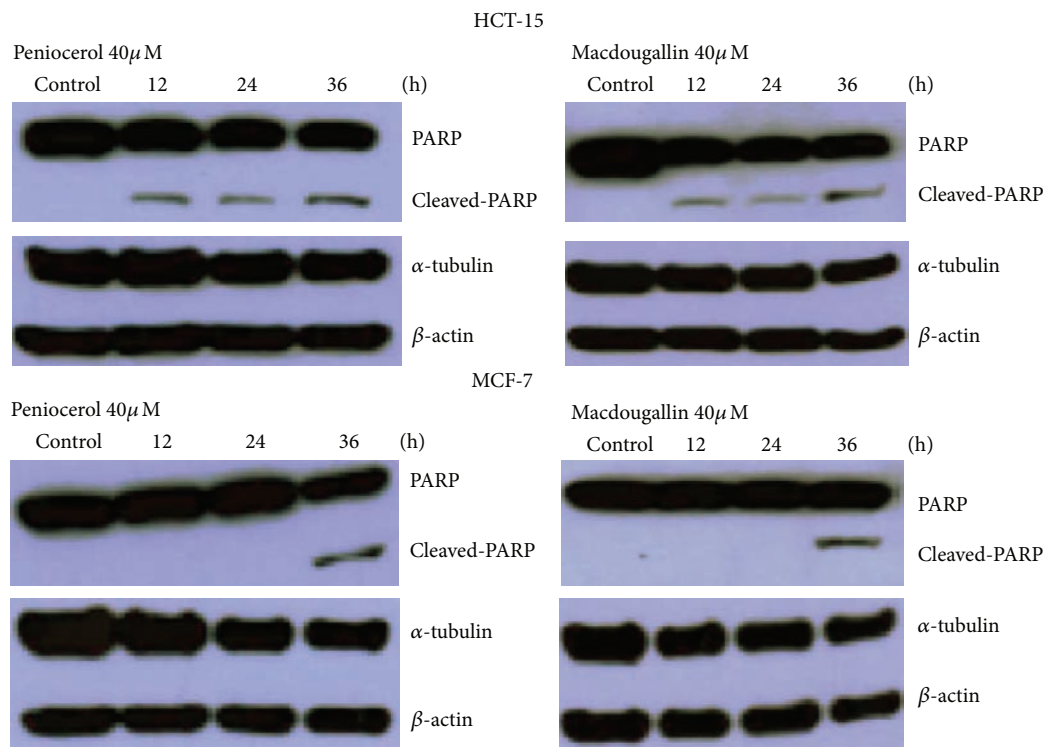


FIGURE 4: PARP cleaved followed by treatment with peniocerol and macdougallin.

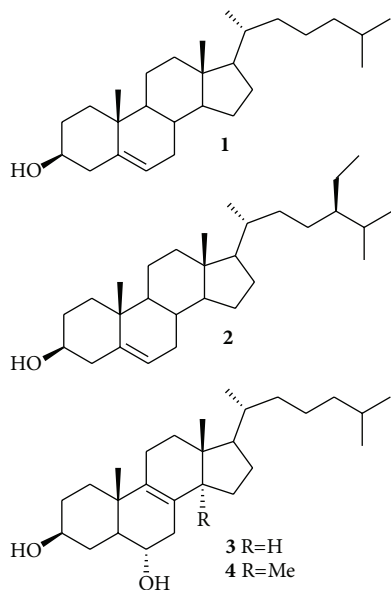


FIGURE 5

anticancer drugs such as etoposide, cisplatin, and paclitaxel are known to induce apoptosis in target cells [15].

In recent years, several studies performed *in vitro* have shown that the cytotoxic effects of several sterols are mediated by apoptosis [16, 17]. In agreement with these observations, the Annexin V/Propidium Iodide double-staining results

presented here showed that cell death induced by 3 and 4 (Figure 5) is also due to apoptosis (Tables 2 and 3).

On the other hand, it is known that PARP is a substrate for certain caspases that get activated during early stages of apoptosis, and then the detection of cleavage of PARP serves as a marker of apoptosis. Our results showed that 3 and 4 induced cleavage of PARP in HCT-15 and MCF-7 cells (Figure 4).

Additionally, both peniocerol (3) and macdougallin (4) induced HCT-15 and MCF-7 cell cycle arrest that occurs in G_0/G_1 phase (Figure 2). This result suggests the possibility that 3 and 4 could be useful for the control of cancer growth [18].

It is worth noting that the only structural difference between peniocerol and macdougallin is the presence of α -methyl group at C-14 in the latter. Since both sterols showed the same biological activities, then the presence of the C-14 methyl group in the macdougallin structure is not relevant for its biological activities.

Phytosterols have been shown to promote apoptosis, an important mechanism in the inhibition of carcinogenesis. An increased apoptosis of prostate cancer cells has been observed by 73% on β -sitosterol treatment at a dosage of 16 μ M. Likewise, it has been observed that treatment of human leukemia cells with β -sitosterol at varying concentrations for 72 h increased the percentage of apoptotic cells in a dose-dependent manner.

The mechanism by which β -sitosterol promotes apoptosis has been investigated and it has been shown that treatment of human leukemia cells with β -sitosterol resulted in

an increased activity of caspase-3 in a dose-dependent manner [16]. However, it has been reported that the intake of β -sitosterol could accelerate intestinal tumorigenesis in Apc^{Min} which makes the intake of β -sitosterol somewhat hazardous [12].

Although we have not shown the exact mechanism of apoptosis induced by macdougallin and peniocerol, there is a possibility that 3 and 4 could induce programmed cell death in a similar way as β -sitosterol does.

M. geometrizans, known as “garambullo,” is a medicinal plant used by the Otomi and Mixtec ethnic groups as anti-inflammatory remedy; our previous studies showed that sterols 3 and 4 are potent anti-inflammatory agents; these findings supported the traditional use of this species [13]. It is known that inflammatory cells and inflammatory mediators are present in almost all tumor types irrespective of the trigger for development [19]. Then it has been proposed that anti-inflammatory agents could help treat cancer; for example, it has been reported that daily use of aspirin is associated with a significant reduction in the incidence of colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer [20].

5. Conclusions

If we take into account both anti-inflammatory properties and their apoptotic effects, it is feasible to assume that sterols 3 and 4 might be considered as prototypes for possible development of new anticancer agents.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

Mario Augusto Bolaños Carrillo thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for a scholarship to pursue his PhD studies at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Instituto de Química UNAM staff as well as that provided by the Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán.”

References

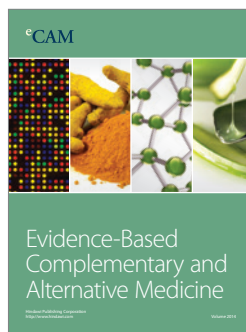
- [1] A. Otaegui-Arrazola, M. Menéndez-Carreño, D. Ansorena, and I. Astiasarán, “Oxysterols: a world to explore,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, no. 12, pp. 3289–3303, 2010.
- [2] E. Hovenkamp, I. Demonty, J. Plat, D. Lütjohann, R. P. Mensink, and E. A. Trautwein, “Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge,” *Progress in Lipid Research*, vol. 47, no. 1, pp. 37–49, 2008.
- [3] F. Guardiola, R. Codony, P. B. Addis, M. Rafecas, and J. Boatella, “Biological effects of oxysterols: current status,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 34, no. 2, pp. 193–211, 1996.
- [4] B. Sottero, P. Gamba, S. Gargiulo, G. Leonarduzzi, and G. Poli, “Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 6, pp. 685–705, 2009.
- [5] W. Meyer, H. Jungnickel, M. Jandke, K. Dettner, and G. Spiteller, “On the cytotoxicity of oxidized phytosterols isolated from photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum* tested on meal-worms *Tenebrio molitor*,” *Phytochemistry*, vol. 47, no. 5, pp. 789–797, 1998.
- [6] L. Maguire, M. Konoplyannikov, A. Ford, A. R. Maguire, and N. M. O’Brien, “Comparison of the cytotoxic effects of β -sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7 β -hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells,” *British Journal of Nutrition*, vol. 90, no. 4, pp. 767–775, 2003.
- [7] O. Kenny, Y. O’Callaghan, N. M. O’Connell, F. O. McCarthy, A. R. Maguire, and N. M. O’Brien, “Oxidized derivatives of dihydrobrassicasterol: cytotoxic and apoptotic potential in U937 and HepG2 cells,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 23, pp. 5952–5961, 2012.
- [8] T. A. Woyengo, V. R. Ramprasath, and P. J. H. Jones, “Anticancer effects of phytosterols,” *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 63, no. 7, pp. 813–820, 2009.
- [9] G. O. Ifere, E. Barr, A. Equan et al., “Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines,” *Cancer Detection and Prevention*, vol. 32, no. 4, pp. 319–328, 2009.
- [10] A. B. Awad, H. Williams, and C. S. Fink, “Phytosterols reduce in vitro metastatic ability of MDA-MB-231 human breast cancer cells,” *Nutrition and Cancer*, vol. 40, no. 2, pp. 157–164, 2001.
- [11] A. B. Awad, C. S. Fink, H. Williams, and U. Kim, “In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells,” *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 10, no. 6, pp. 507–513, 2001.
- [12] M. Marttinen, A.-M. Pajari, E. Päiväranta et al., “Plant sterol feeding induces tumor formation and alters sterol metabolism in the intestine of Apc^{Min} mice,” *Nutrition and Cancer*, vol. 66, no. 2, pp. 259–269, 2014.
- [13] J. R. Salazar, M. Martínez-Vázquez, C. L. Cespedes et al., “Anti-inflammatory and cytotoxic activities of chichipegenin, peniocerol, and macdougallin isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con,” *Zeitschrift für Naturforschung Section C*, vol. 66, no. 1, pp. 24–30, 2011.
- [14] L. D. Via, A. N. García-Argáez, M. Martínez-Vázquez, S. Grancara, P. Martinis, and A. Toninello, “Mitochondrial permeability transition as target of anticancer drugs,” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 20, no. 2, pp. 223–244, 2014.
- [15] Y. Sedletska, M.-J. Giraud-Panis, and J.-M. Malinge, “Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: Importance of apoptotic pathways,” *Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents*, vol. 5, no. 3, pp. 251–265, 2005.
- [16] Y. H. Choi, K. R. Kong, Y.-A. Kim et al., “Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells,” *International Journal of Oncology*, vol. 23, no. 6, pp. 1657–1662, 2003.
- [17] H. Matsuda, J. Akaki, S. Nakamura et al., “Apoptosis-inducing effects of sterols from the dried powder of cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*,” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 57, no. 4, pp. 411–414, 2009.
- [18] N. Ahmad, D. K. Feyes, A.-L. Nieminen, R. Agarwal, and H. Mukhtar, “Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma

cells," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 89, no. 24, pp. 1881-1886, 1997.

- [19] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, "Cancer-related inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 436-444, 2008.
- [20] R. S. Sandler, S. Halabi, J. A. Baron et al., "A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer," *The New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 10, pp. 883-890, 2003.



Hindawi
Submit your manuscripts at
<http://www.hindawi.com>



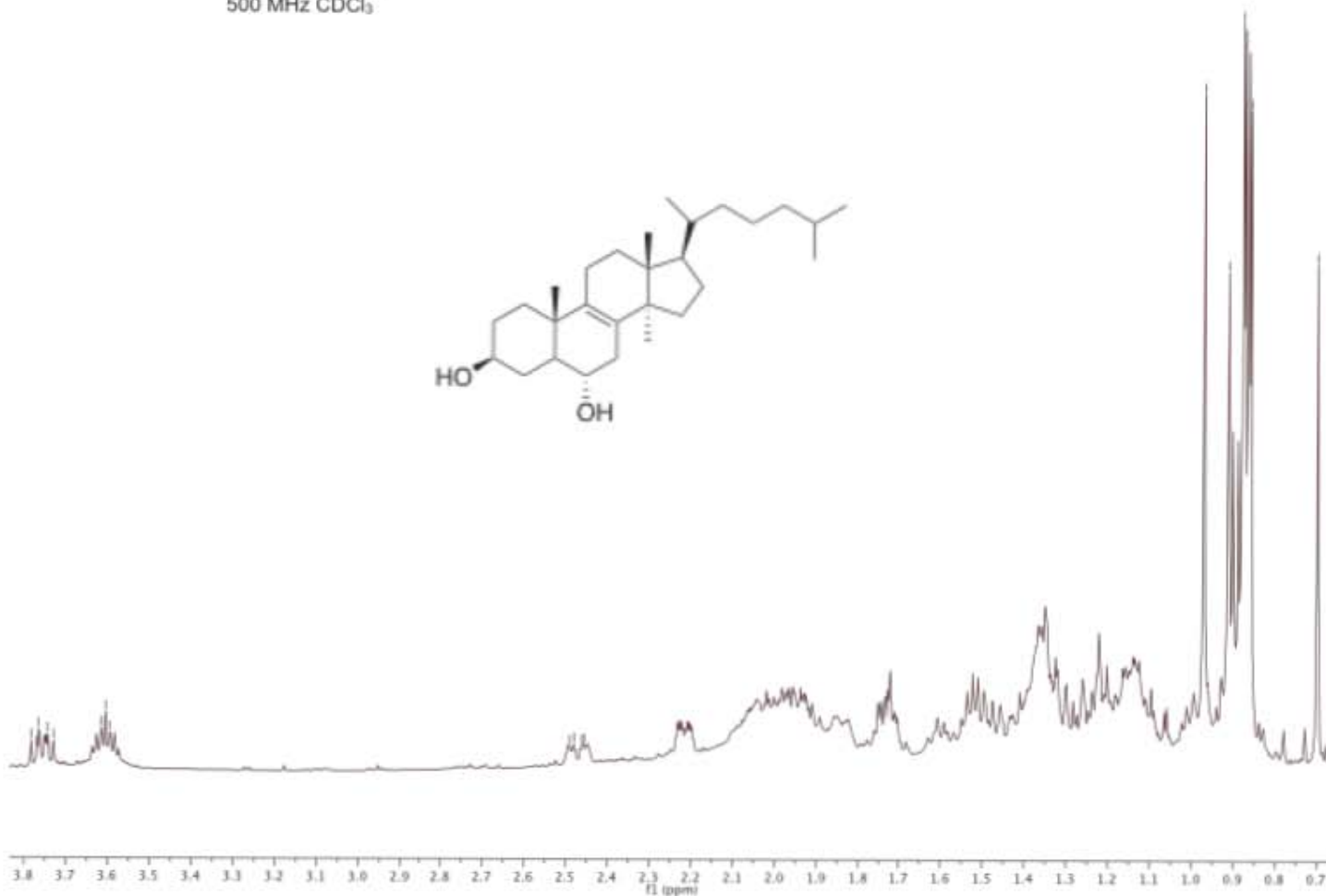
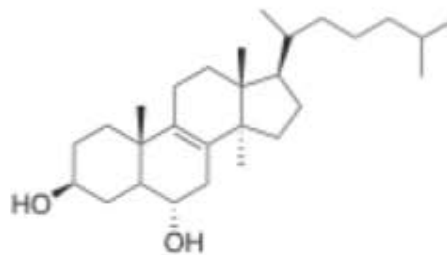
3.72
3.62
3.52
3.42

1.48
1.38
1.28

2.48
2.38
2.28

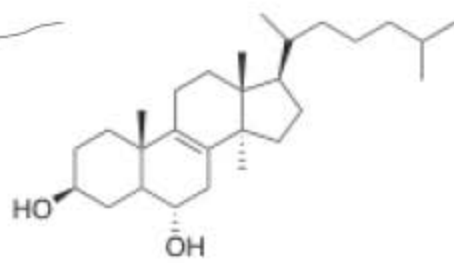
0.97
0.91
0.85
0.79

1H NMR Macdougallin
500 MHz CDCl₃



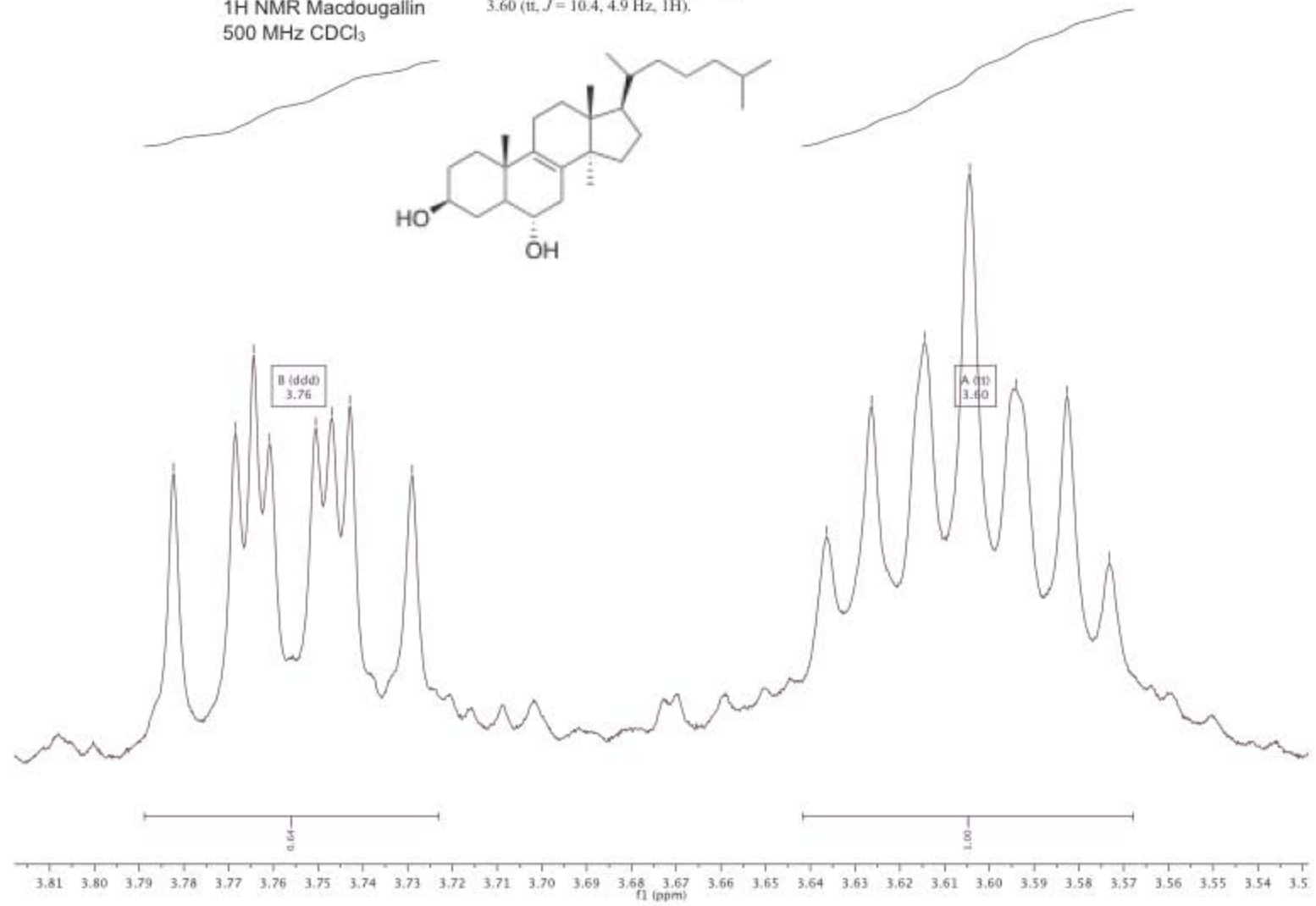
**¹H NMR Macdougallin
500 MHz CDCl₃**

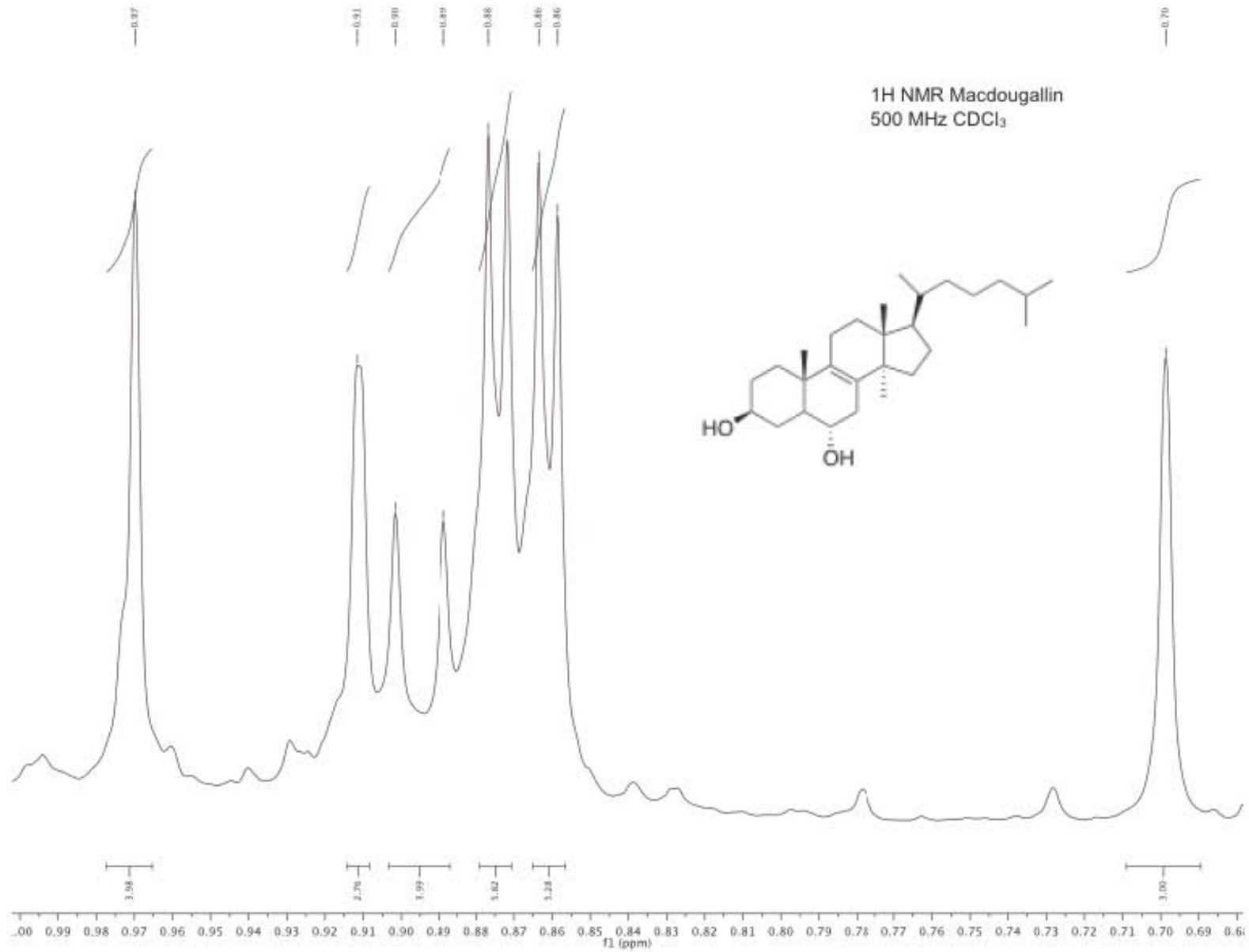
¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ
3.76 (ddd, *J* = 10.8, 8.9, 6.9 Hz, 1H),
3.60 (tt, *J* = 10.4, 4.9 Hz, 1H).



3.78
3.77
3.76
3.75
3.74
3.73

3.64
3.63
3.62
3.61
3.60
3.59
3.58
3.57





133.62
133.00

71.11
67.60

50.42
49.41
47.74

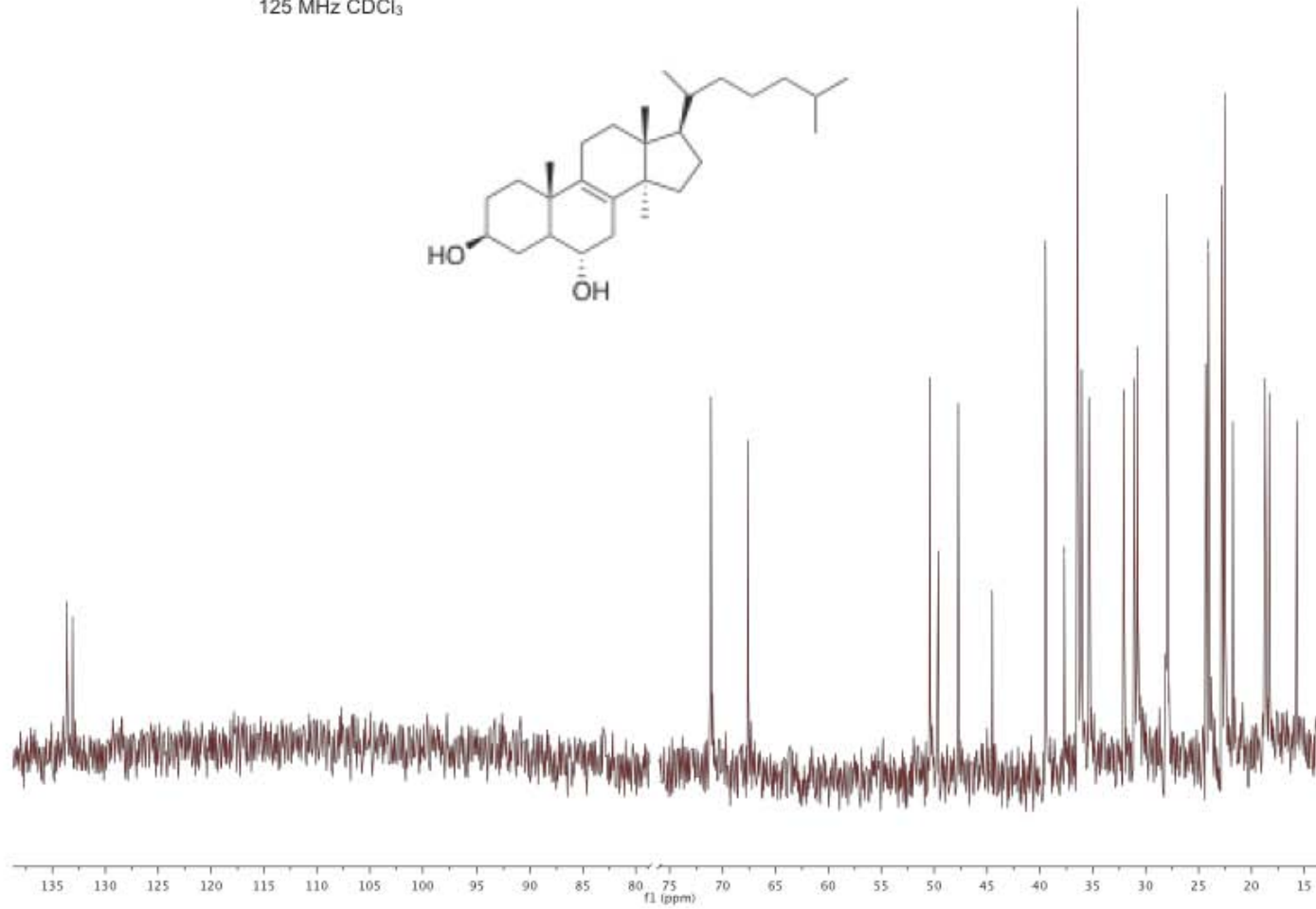
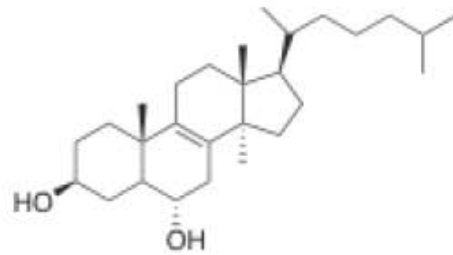
44.32

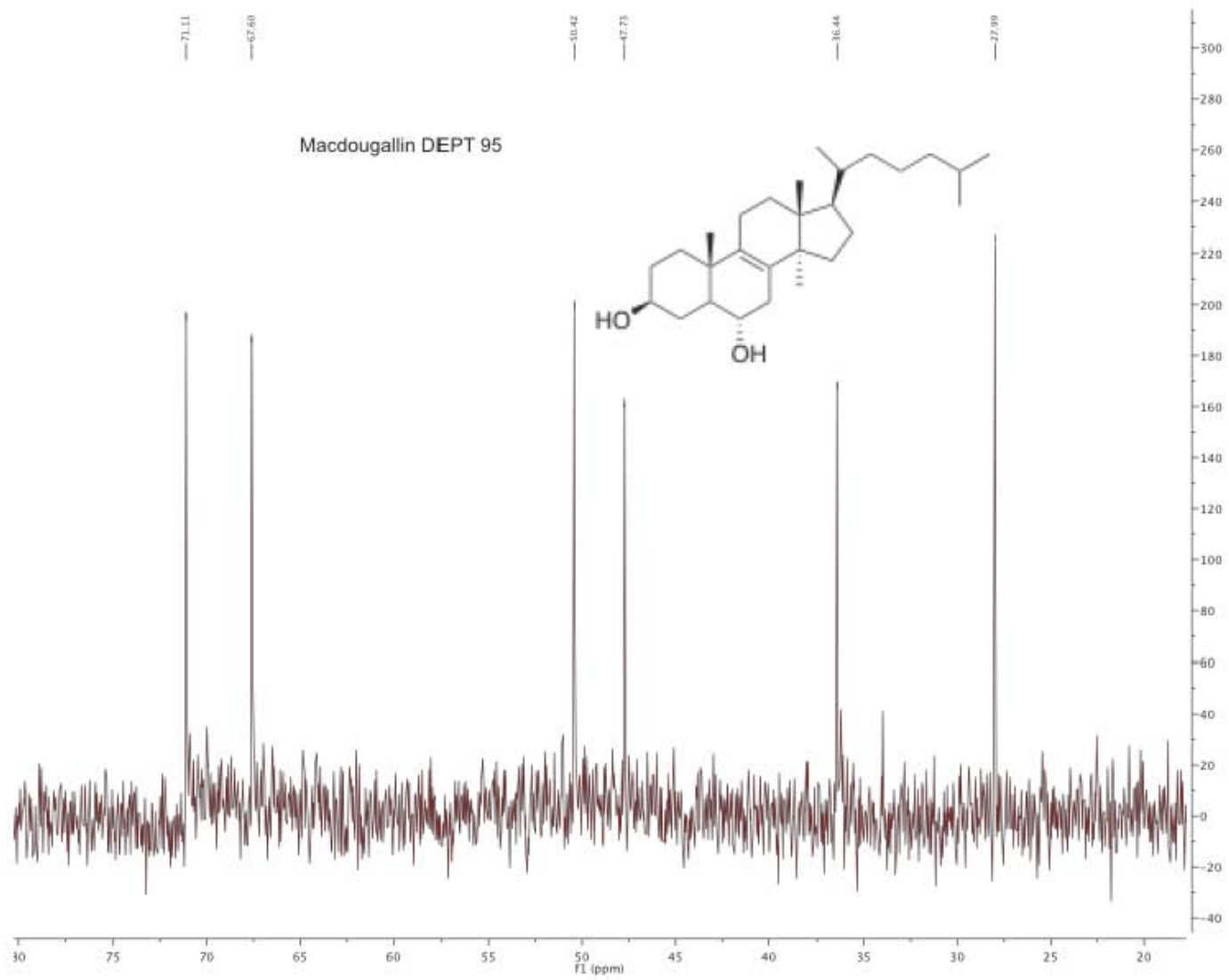
36.56
32.70
30.43

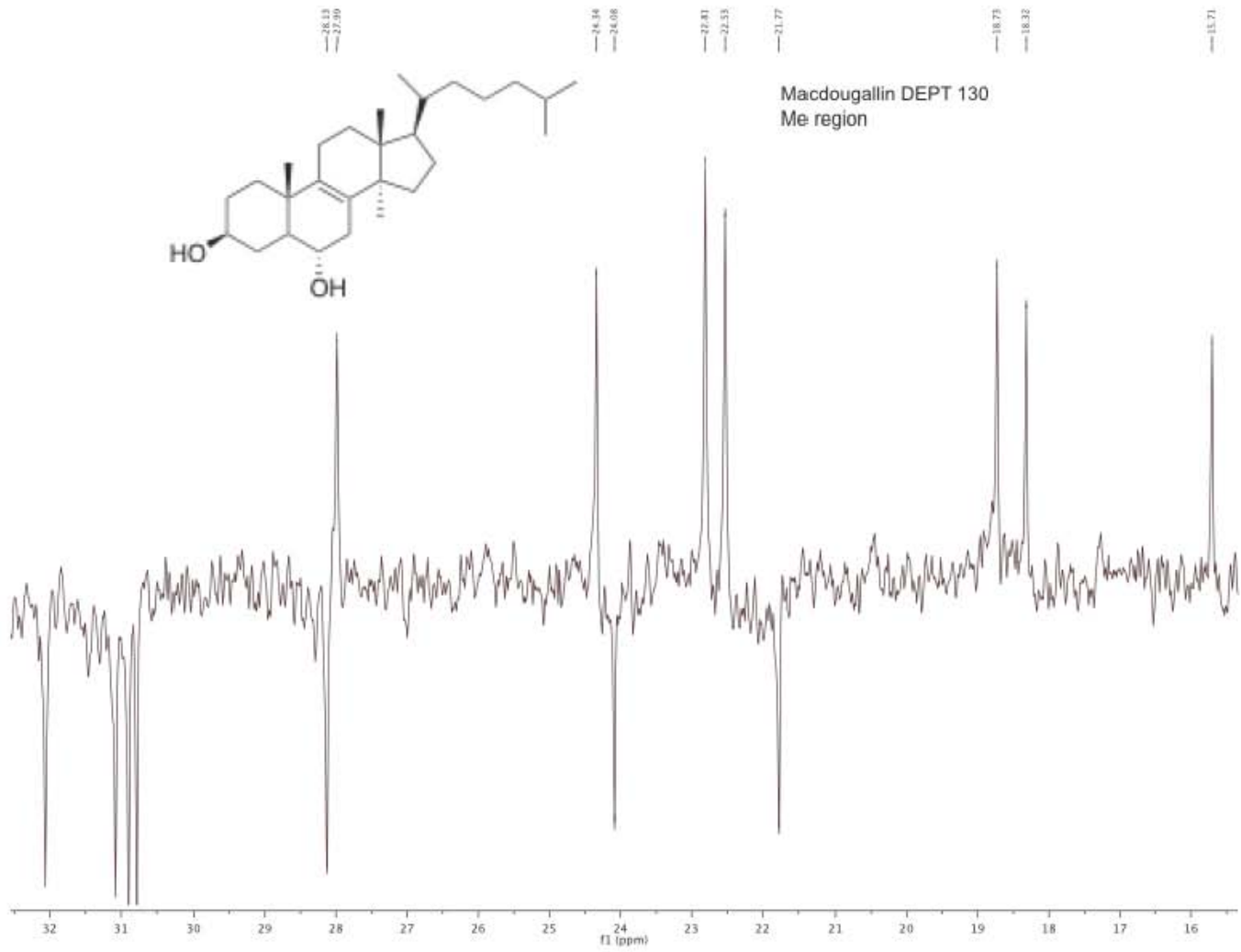
24.08
22.52

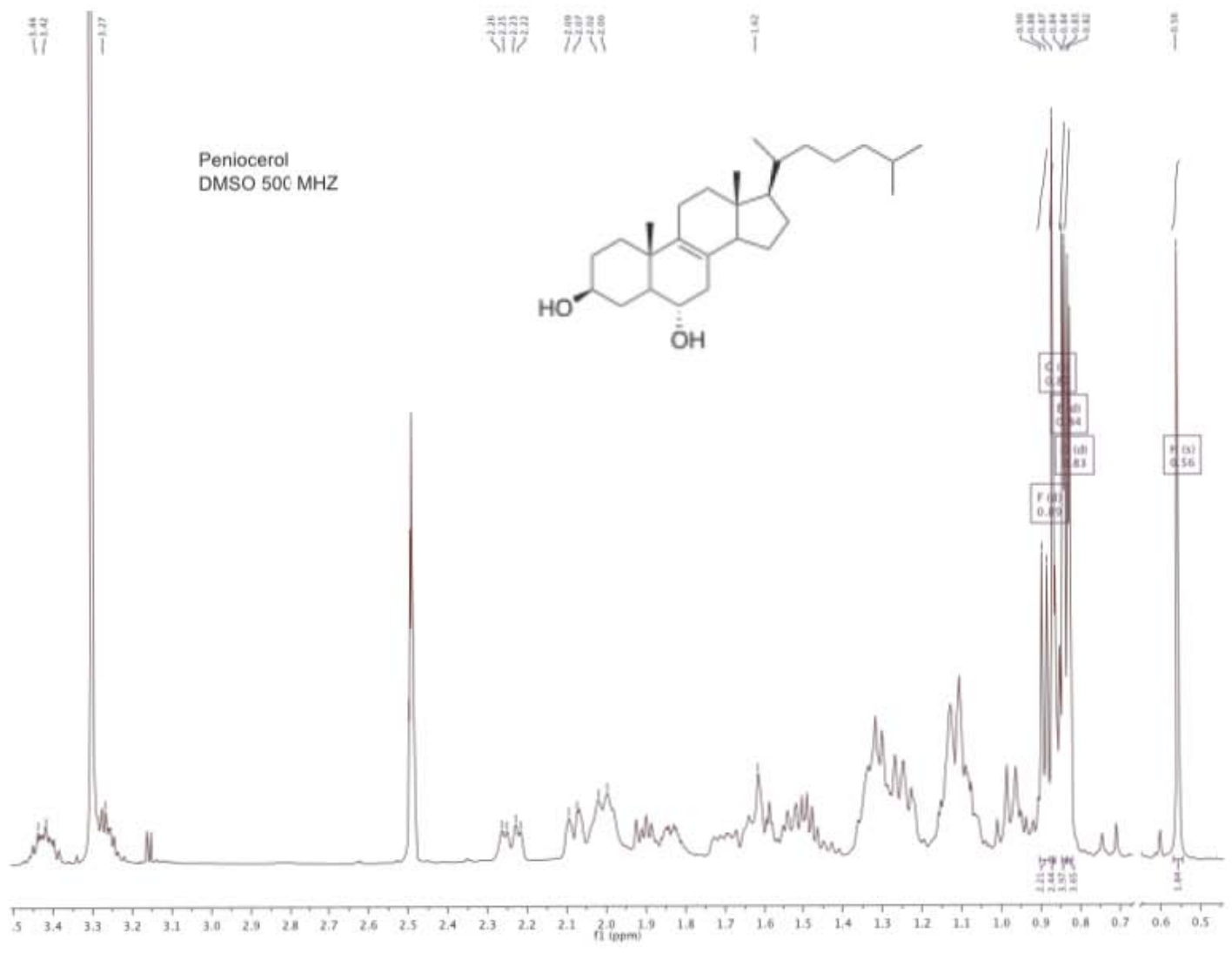
18.77
18.31
15.70

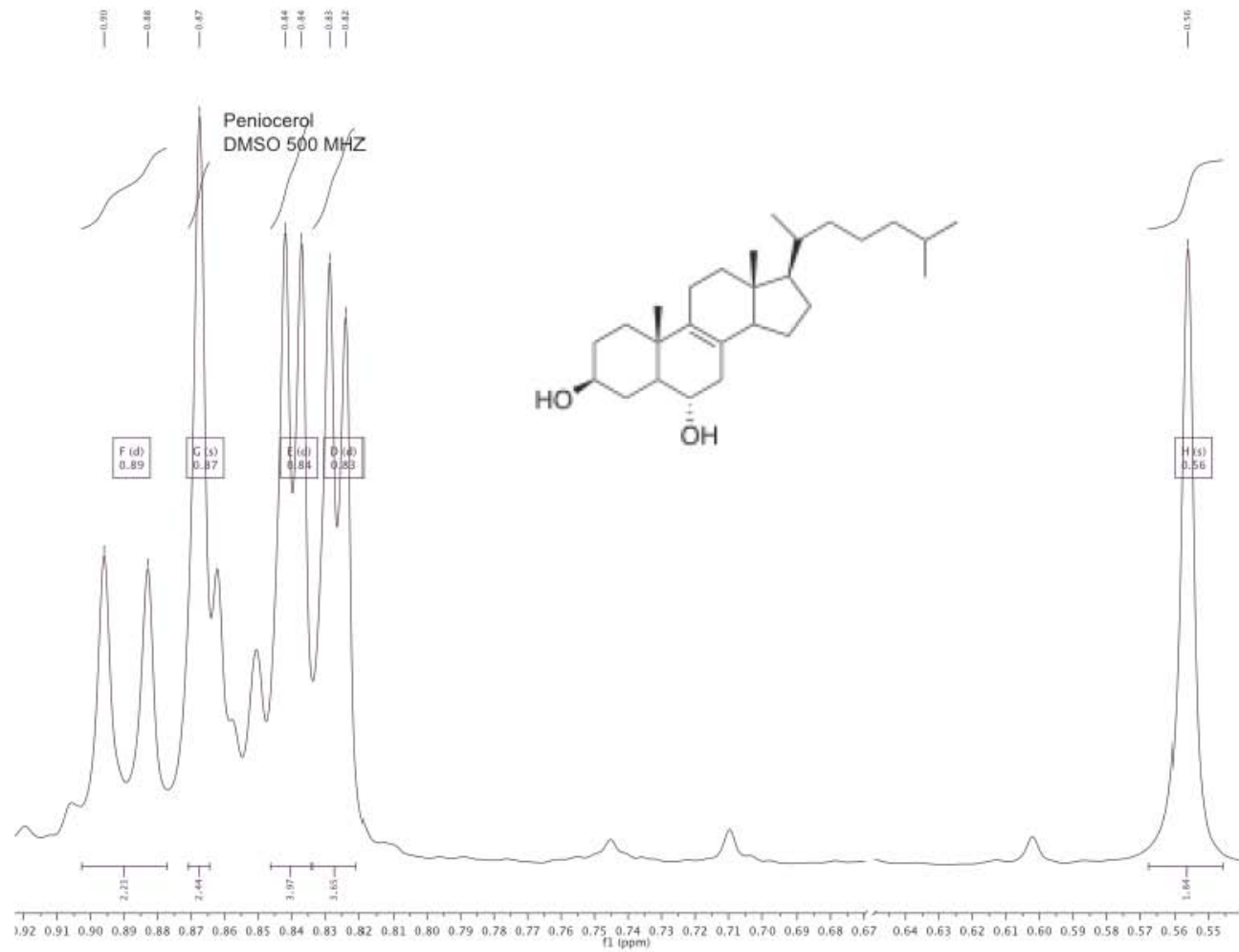
Macdougallin ¹³C NMR
125 MHz CDCl₃

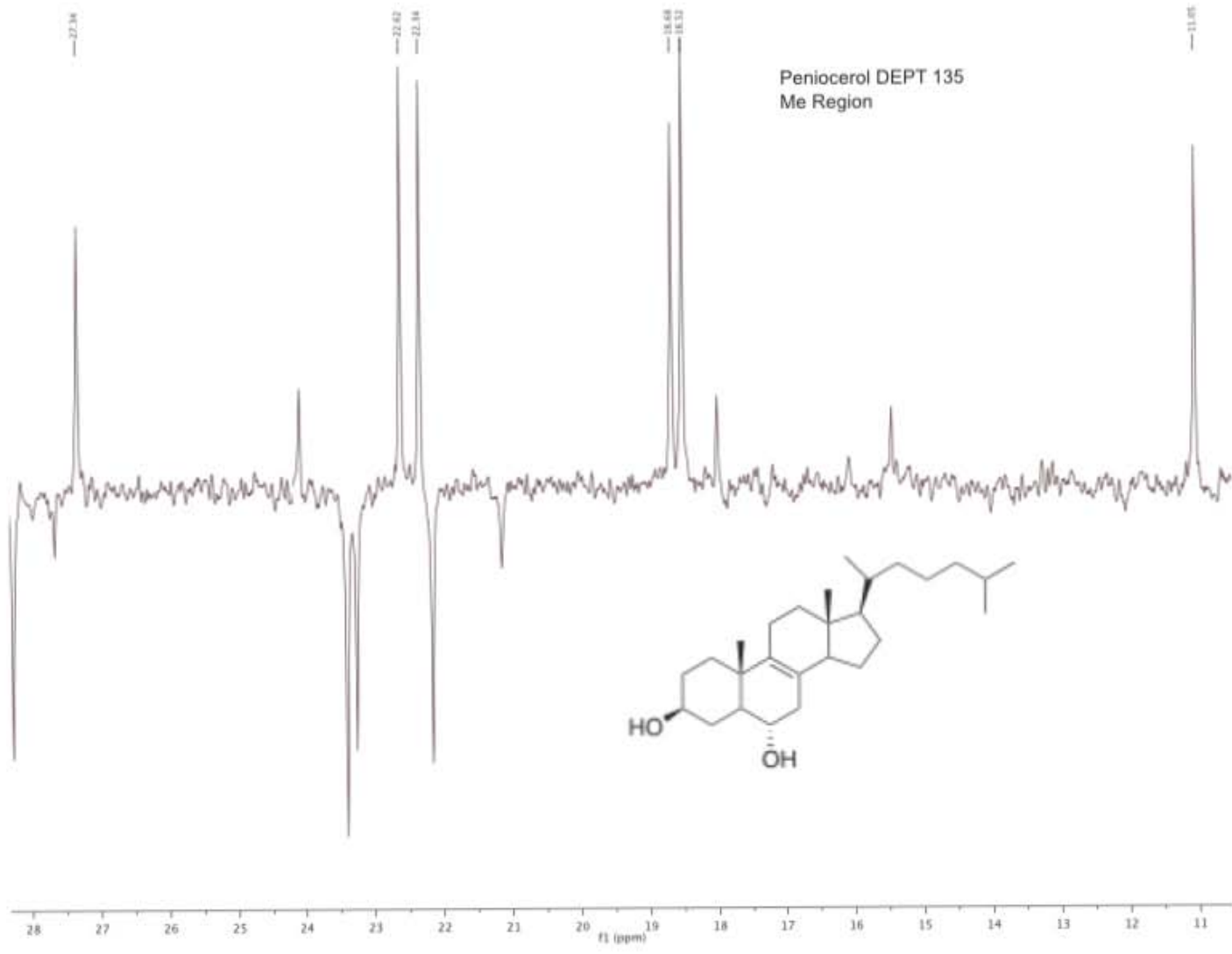


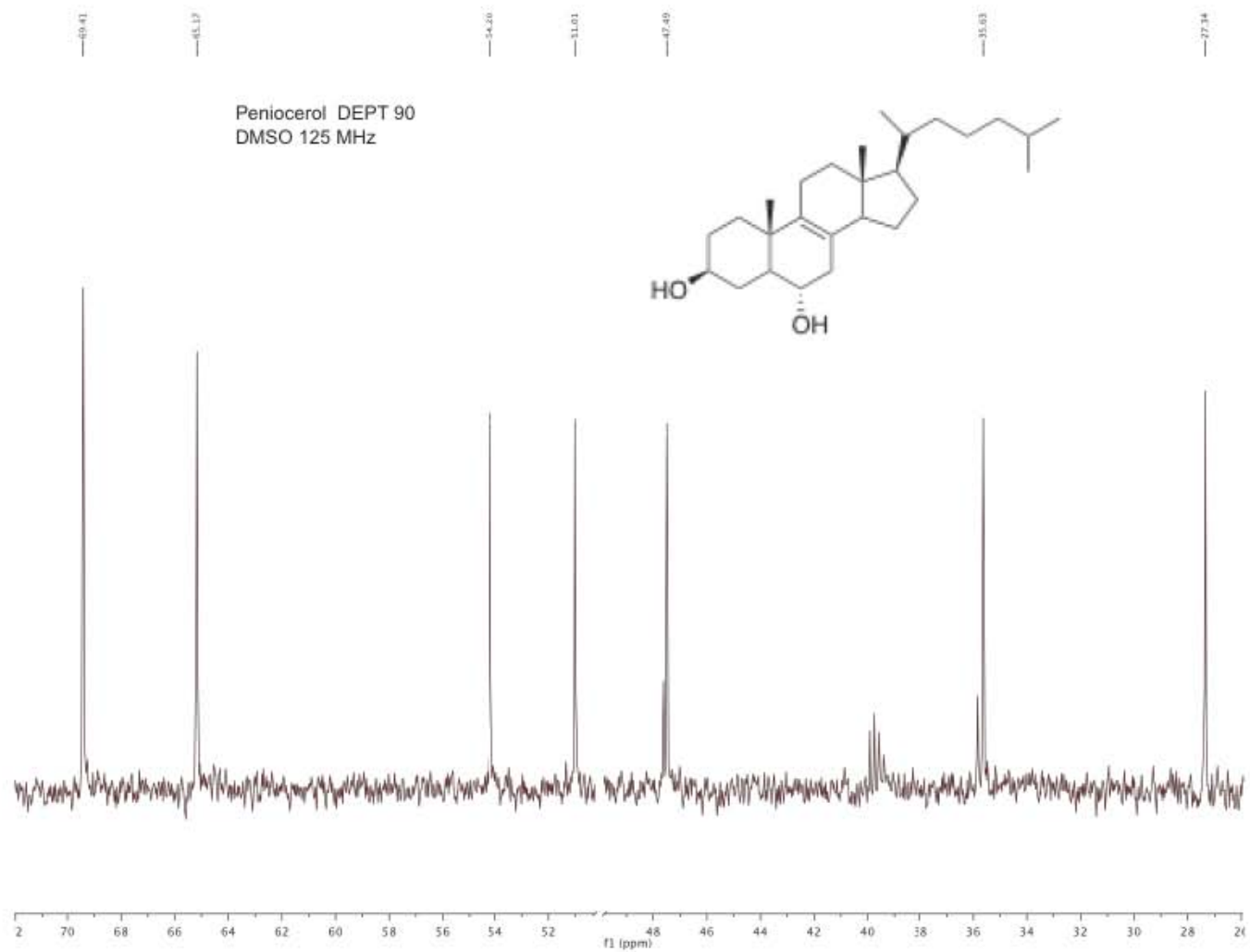








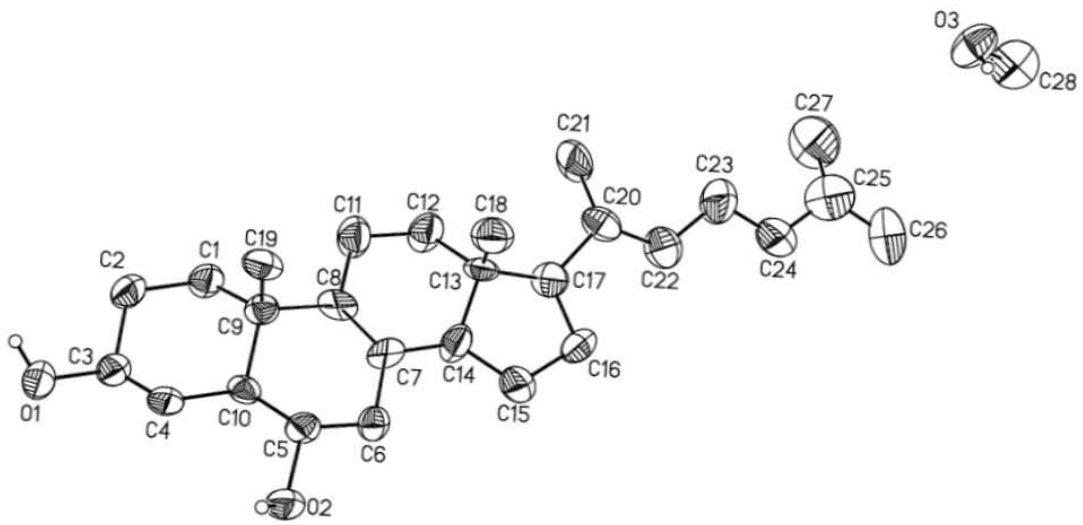
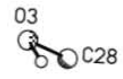
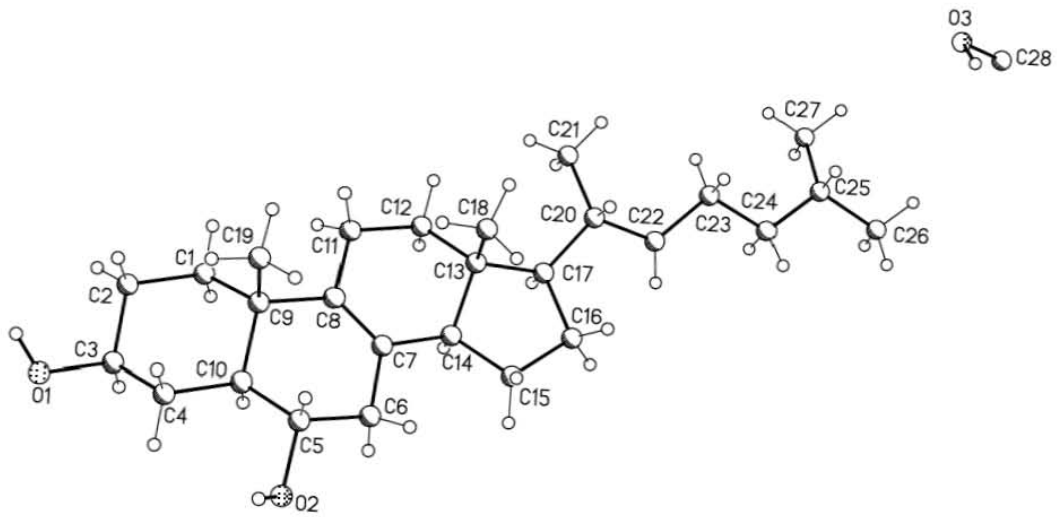




Peniocerol's structure determinate by RX

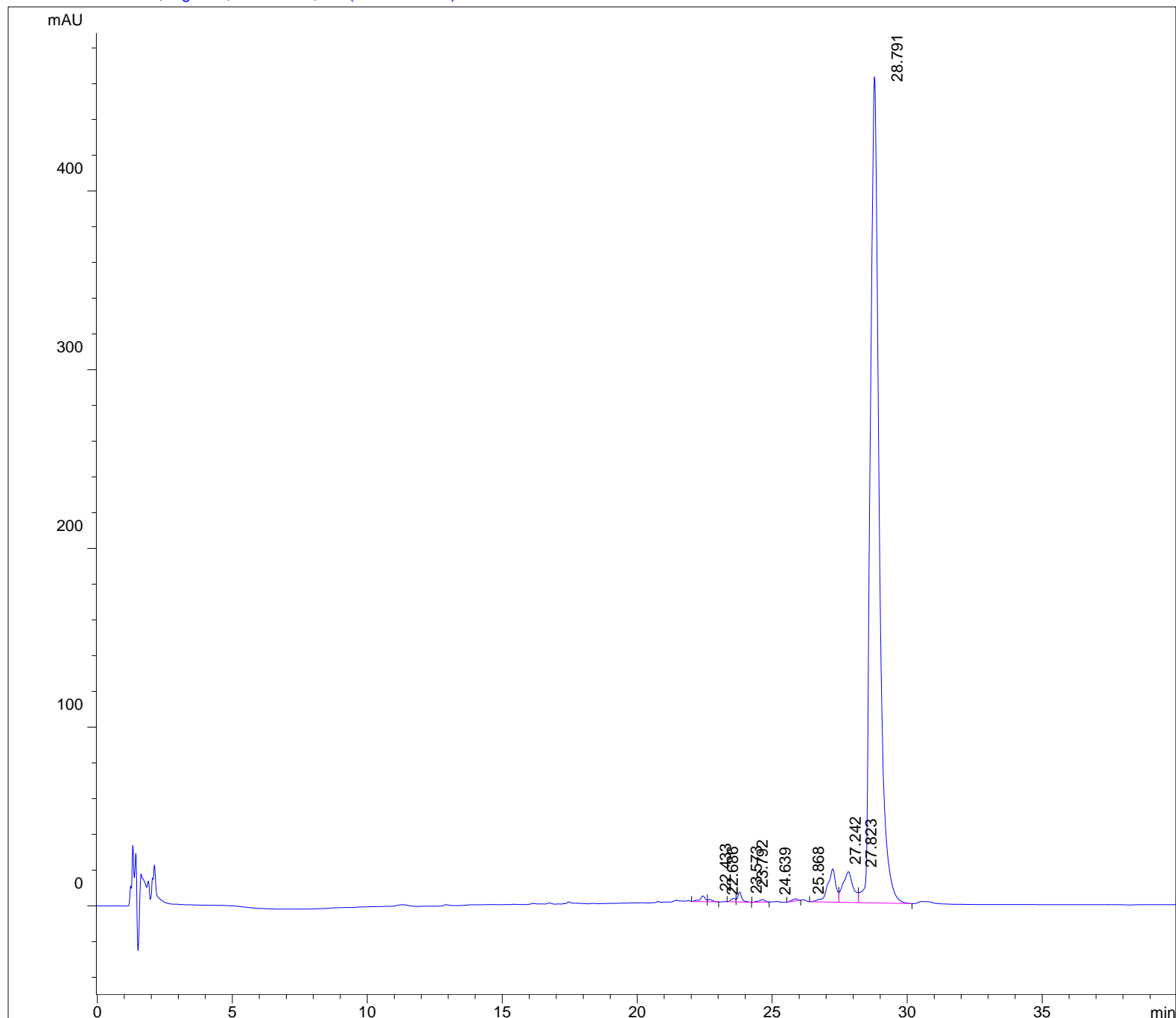
Table 1. Crystal data and structure refinement for **Mgmr**.

Sample code	252MVM08	
Project Title	Mgmr	
Empirical formula	$C_{27}H_{46}O_2CH_3OH$	
Formula weight	434.68	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	$P 2_1 2_1 2_1$	
Unit cell dimensions	a = 8.147(3) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 9.137(3) Å	$\beta = 90^\circ$.
	c = 36.585(14) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	2723.3(18) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.060 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.066 mm ⁻¹	
F(000)	968	
Crystal size / shape / color	0.30 x 0.07 x 0.05 mm / Prism/ Colorless	
Theta range for data collection	2.23 to 25.68°.	
Diffractometer used /Scan Mode	Bruker Smart APEX AXS CCD area detector/ omega scans	
Index ranges	$-9 \leq h \leq 9, -11 \leq k \leq 10, -44 \leq l \leq 44$	
Reflections collected	29873	
Independent reflections	5129 [R(int) = 0.1862]	
Completeness to theta = 25.68°	99.7 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	5129 / 3 / 295	
Goodness-of-fit on F ²	1.000	
Final R indices [I > 2sigma(I)]	R1 = 0.1031, wR2 = 0.1219	
R indices (all data)	R1 = 0.2490, wR2 = 0.1637	
Absolute structure parameter	Not determined.	
Largest diff. peak and hole	0.158 and -0.129 e Å ⁻³	
Solved by	Simon Hernandez-Ortega	



=====
Acq. Operator : Erendira Garcia
Acq. Instrument : CL6-LCR-IQUI Location : Vial 1
Injection Date : 3/20/2015 4:56:44 PM
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MARIANO.M
Last changed : 3/20/2015 3:25:27 PM by Erendira Garcia
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\123.M
Last changed : 3/20/2015 4:15:38 PM by CARMEN
(modified after loading)
Sample Info : Eclipse Plus C18 3.5um 100x2.1mm flujo 0.2 mL/min 254 nm
Agua/ACN Inicial 80/20 20 min 0/100

DAD1 C, Sig=254,16 Ref=360,100 (MVM00009.D)



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 C, Sig=254,16 Ref=360,100

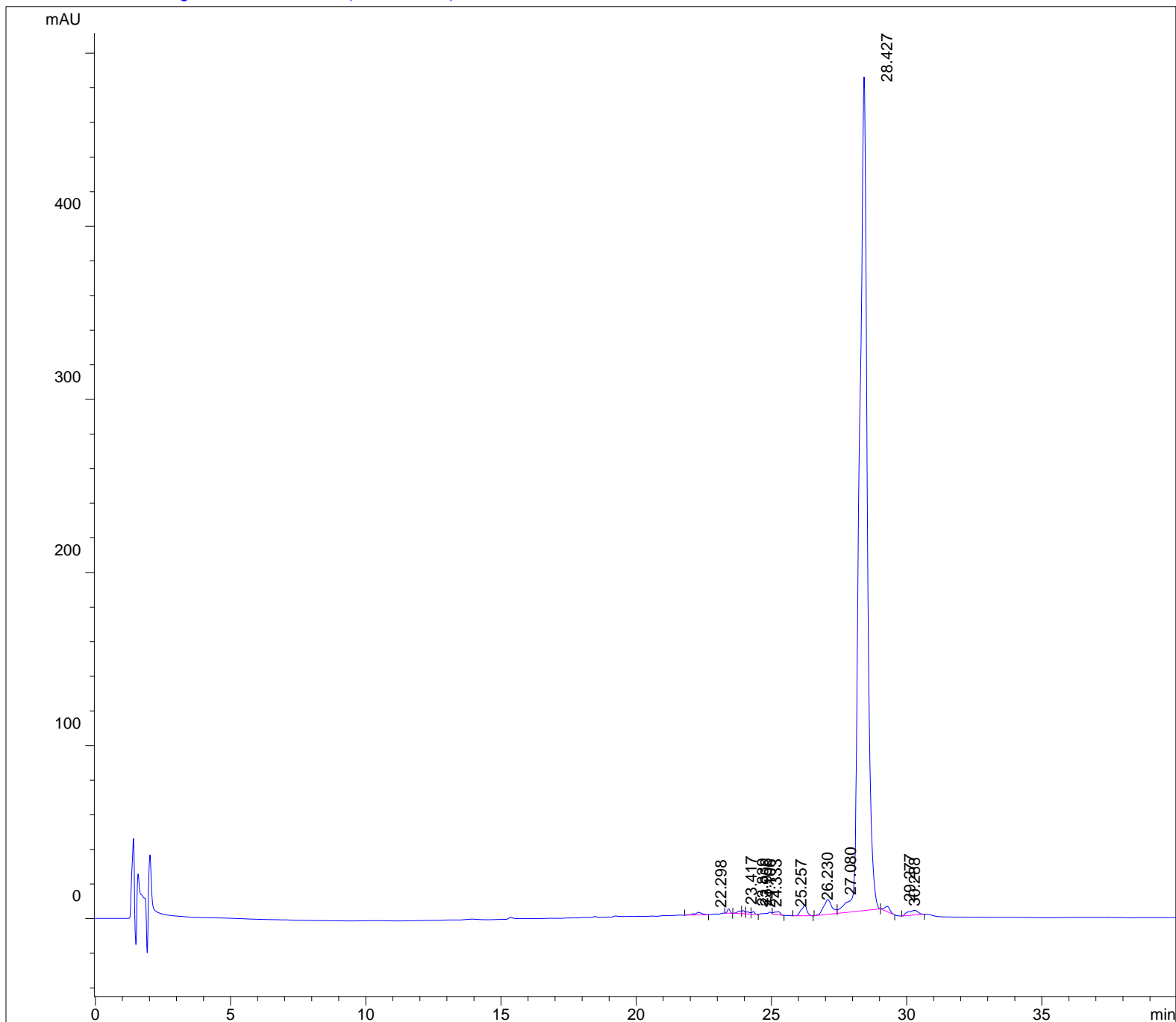
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	22.433	BV	0.1919	43.96069	3.24812	0.3798
2	22.686	VB	0.1573	15.55498	1.38220	0.1344
3	23.573	BV	0.1635	21.66733	1.98282	0.1872
4	23.792	VB	0.1538	57.87674	5.54340	0.5001
5	24.639	BB	0.2283	22.81826	1.44417	0.1972
6	25.868	BB	0.2154	18.23200	1.19906	0.1575
7	27.242	BV	0.2839	388.60580	18.58577	3.3577
8	27.823	VV	0.3577	453.43222	17.19118	3.9178
9	28.791	VB	0.3224	1.05515e4	462.12866	91.1683

Totals : 1.15736e4 512.70538

=====
*** End of Report ***

=====
Acq. Operator : Erendira Garcia
Acq. Instrument : CL6-LCR-IQUI Location : Vial 1
Injection Date : 3/20/2015 3:41:44 PM
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MARIANO.M
Last changed : 3/20/2015 3:25:27 PM by Erendira Garcia
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\123.M
Last changed : 3/20/2015 3:26:08 PM by CARMEN
Sample Info : Eclipse Plus C18 3.5um 100x2.1mm flujo 0.2 mL/min 254 nm
Agua/ACN Inicial 80/20 20 min 0/100

DAD1 C, Sig=254,16 Ref=360,100 (MVM00008.D)



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 C, Sig=254,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	22.298	BB	0.2518	28.87656	1.50566	0.2849
2	23.417	BB	0.1036	16.44096	2.47249	0.1622
3	23.839	BV	0.1359	15.26783	1.53679	0.1506
4	23.956	VV	0.1055	13.32459	1.81870	0.1314
5	24.106	VV	0.1361	12.20759	1.22673	0.1204
6	24.333	VB	0.1044	10.71939	1.51783	0.1057
7	25.257	VB	0.1987	26.18956	1.78988	0.2584
8	26.230	BB	0.1944	88.25874	6.26259	0.8707
9	27.080	BV	0.3049	182.31735	8.54637	1.7985
10	28.427	VB	0.2772	9627.62500	481.68204	94.9748
11	29.277	BB	0.2056	42.91954	3.09767	0.4234
12	30.288	BB	0.3763	72.88666	2.70575	0.7190

Totals : 1.01370e4 514.16252

=====
*** End of Report ***