

## Efecto *in vitro* de los terpenos lupeol y casearina G sobre células sanguíneas y tumorales

OMAR A. DUPUY L.<sup>1,a,b</sup>, JOSÉ A. BONILLA V.<sup>2,b</sup>,  
RENATO MURILLO<sup>3,b</sup>, PETER TAYLOR<sup>4,b</sup>, MARÍA JESÚS ABAD<sup>4,c</sup>,  
LORENA GONZÁLEZ<sup>1,c</sup>, JOHANNA JULIAO A.<sup>1,d</sup>

### *In vitro* effect of lupeol and casearin G on peripheral blood mononuclear and tumor cells

**Background:** The rainforest is an important source of natural compounds with therapeutic properties. Although there are many anti-inflammatory and antineoplastic drugs available to the clinician, there is an ongoing need for new therapeutic drugs with fewer serious adverse effects. **Aim:** To evaluate the *in vitro* cytotoxic effects of lupeol and casearin G on tumor cells, on phagocytic activity and nitric oxide (NO) production by blood mononuclear cells. **Material and Methods:** The cytotoxic effect of these compounds on cell lines MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and PC-3 (human prostate cancer) was measured by a colorimetric assay (MTS/PMS) and the sulphorhodamine B assay. Peripheral blood mononuclear cells were obtained from eight healthy volunteers. The effect of these compounds on nitric oxide (NO) production was measured using the Griess reaction. Their effect on phagocytic activity of PBMC was also evaluated. **Results:** Lupeol ( $\geq 2$  mM) resulted in a reduction of both the phagocytic index and the percentage of phagocytic monocytes and macrophages. Treatment of monocytes/macrophages with lupeol (72  $\mu$ M) and casearin G (4  $\mu$ M) reduced the production of NO. Neither lupeol (< 969  $\mu$ M) nor casearin G (< 55  $\mu$ M) had cytotoxic effects on PBMC. Casearin G showed both cytotoxic (IC<sub>50</sub>, LC<sub>50</sub>) and cytostatic (GI<sub>50</sub>) effects against tumor cells, PC-3 (IC<sub>50</sub> = 12.5  $\mu$ M; GI<sub>50</sub> = 13.3  $\mu$ M; LC<sub>50</sub> = 51.9  $\mu$ M) and MCF-7 (IC<sub>50</sub> = 112.8  $\mu$ M; GI<sub>50</sub> = 11.8  $\mu$ M; LC<sub>50</sub> = 49.4  $\mu$ M), as well as a hemolytic effect ( $\geq 182$   $\mu$ M). **Conclusions:** These observations indicate that lupeol and casearin G might be useful compounds in the preparation of anti-inflammatory drugs, whereas casearin G might be useful in the elaboration of antitumor drugs.

(Rev Med Chile 2013; 141: 1150-1157).

**Key words:** Antineoplastic agents, phytogetic; Diterpenes, clerodane; Pentacyclic triterpenes.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones en Biotecnología y Ciencias Biomédicas (IIBC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Latina de Panamá, Panamá.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

<sup>3</sup>Escuela de Química y CIPRONA, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

<sup>4</sup>Laboratorio de Patología Celular y Molecular, Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela.

<sup>a</sup>MD.

<sup>b</sup>PhD.

<sup>c</sup>Licenciada en Biología.

<sup>d</sup>Licenciada en Biotecnología.

Investigación financiada por la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT). Ninguna institución tuvo influencia en el diseño del estudio; ni en la recolección, análisis o interpretación de los datos; ni en la preparación, revisión o aprobación del manuscrito.

Recibido el 21 de marzo de 2012, aceptado el 3 de julio de 2013.

Correspondencia a:

Omar A. Dupuy L.

Instituto de Investigaciones en Biotecnología y Ciencias Biomédicas (IIBC), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Latina de Panamá, Panamá, Panamá.

Teléfono: (507) 2076709

E-mail: omarielsag@yahoo.com

El lupeol, un triterpeno aislado de plantas como *Zanthoxylum monophyllum* (Rutaceae), mostró actividad supresora sobre células T, inhibición de la producción de interleucina 2 (IL-2), disminución de la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y reducción de la fagocitosis<sup>1,2</sup>. Se ha

descrito que el lupeol posee un débil efecto inmunostimulador sobre la producción de peróxido de hidrógeno por los macrófagos<sup>3</sup>. Por otro lado, el lupeol ha mostrado actividad antitumoral contra varias líneas celulares cancerígenas<sup>4</sup>.

Por su parte, la casearina G es un diterpeno que ha sido aislado de *Casearia sylvestris* (Fla-

courtiaceae), una planta cuyo uso está asociado a propiedades antiinflamatorias, antifúngicas<sup>4</sup> y antiulcerosas<sup>5</sup>. Estudios de citotoxicidad muestran que *C. sylvestris* presenta un interesante potencial antitumoral debido a la presencia de casearinas<sup>6,7</sup>. Ha sido descrito que el aceite de *C. sylvestris* presenta citotoxicidad contra las células tumorales HeLa, A-549 y HT-29 y efecto hemolítico sobre eritrocitos de diferentes especies<sup>8</sup>.

Existe una asociación entre inflamación y cáncer<sup>9</sup>, de allí que un mismo principio activo pueda tener propiedades antiinflamatorias y antitumorales, como el millerenólido y la thieleanina<sup>10-12</sup>.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto citotóxico *in vitro* del lupeol y la casearina G sobre células tumorales y el efecto *in vitro* de estos compuestos sobre la viabilidad, actividad fagocítica y producción de NO de células sanguíneas.

## Materiales y Métodos

### Obtención de compuestos

Los compuestos fueron aislados de las plantas *Z. monophyllum* (Código: JVR 13509) y *C. sylvestris* (Código: JVR 13508), colectadas en El Rodeo, San José, Costa Rica, e identificadas por Luis Poveda (botánico de la Universidad Nacional, Costa Rica, donde reposa la muestra testigo). El lupeol y la casearina G (Figura 1) fueron aislados y purificados utilizando técnicas de extracción descritas con anterioridad por otros investigadores<sup>13</sup> y su estructura química fue determinada por técnicas de resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones. Un milígramo de compuesto fue disuelto en 0,1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y diluido en 0,9 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma, No. Cat. R7388), para obtener una solución patrón de 1 mg/ml.

### Cultivo de células

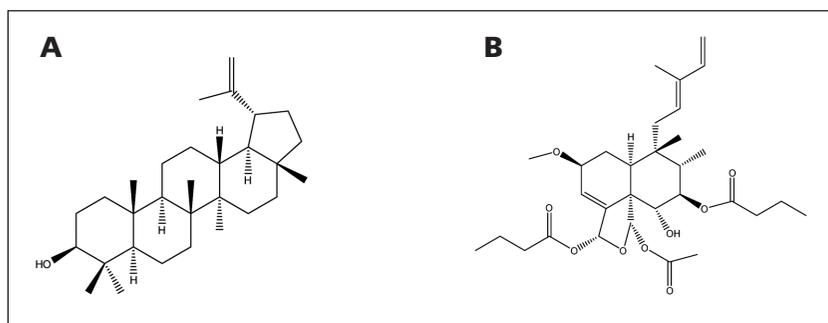
Las células MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) y PC-3 (cáncer de próstata humano) fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% (Gibco, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Sigma Chemical Corp., USA).

Las células fueron incubadas a 37°C en cámara húmeda, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue reemplazado cada cuatro días y los pasajes fueron realizados cada siete días.

El número y viabilidad celular fueron determinados por exclusión con azul tripán.

### Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Esta investigación fue aprobada por el Comité Nacional de Bioética de la Investigación de Panamá. Previa información y consentimiento de ocho voluntarios aparentemente sanos, las muestras de sangre total fueron colectadas en tubos estériles al vacío, con heparina como anticoagulante. Las CMSP fueron separadas mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) como lo indica el fabricante. Brevemente, la sangre fue diluida 1:2 en tampón de fosfatos (PBS) y fue colocada sobre un colchón de 2 ml Ficoll-Hypaque 1,044. Luego fue centrifugada a 1800 rpm por 45 min a 20°C. Las células mononucleares fueron extraídas y lavadas con PBS estéril, pH 7,2. Finalmente, las células fueron resuspendidas en RPMI 1640, suplementado con SFB al 10%, 50 mg/ml de estreptomina, 100 UI/ml de penicilina, 2 mM de glutamina, 5 mM de 2-mercaptoetanol, 10 mM de solución MEM de aminoácidos esenciales, 45 mM de bicarbonato de sodio, 0,8 mM de glucosa y 25 mM de N-(2-hidroxi)etil piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)



**Figura 1.** Estructura química de **A.** Lupeol, un triterpeno aislado de *Zanthoxylum monophyllum*; **B.** 18-butanoil-6- $\alpha$ -hidroxi-Casearina G, un diterpeno aislado de *Casearia sylvestris*.

(HEPES) como tampón. La viabilidad celular fue verificada por observación microscópica utilizando la tinción vital de azul tripán y la concentración fue ajustada a  $1 \times 10^6$  células vivas/ml. El volumen final agregado en cada pocillo fue de 200  $\mu$ l.

#### **Obtención de monocitos/macrófagos humanos**

Doscientos  $\mu$ l de la suspensión de CMSP ( $1 \times 10^6$  células/ml) se incubaron en placas de 96 pocillos con fondo plano (Costar) durante toda la noche, para permitir la adhesión de los monocitos/macrófagos al fondo de los pocillos. Luego el sobrenadante con células no adherentes fue extraído, se realizaron lavados con medio RPMI 1640 y se restituyó el volumen a 200  $\mu$ l con medio de cultivo fresco. Las placas fueron inspeccionadas al microscopio para verificar que la morfología de las células adheridas correspondía a la de monocitos/macrófagos.

#### **Ensayos de citotoxicidad**

Las CMSP ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) tratadas y no tratadas con el lupeol y la casearina G a diferentes concentraciones (0-969  $\mu$ M) fueron incubadas por quintuplicado a 37°C, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Posteriormente, fueron agregados 50  $\mu$ l por pocillo de una solución de sal de tetrazolio 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamino-carbonil)-2H-tetrazol hidróxido (XTT) (1 mg/ml) y N-metilfenacinametasulfato (PMS) (0,01 M). Las células fueron incubadas durante 2 h a 37°C en oscuridad. Posteriormente, fueron transferidos 100  $\mu$ l del sobrenadante de cada pocillo a otra placa de 96 pocillos y se cuantificó el cambio de color en un lector de microplacas, a una longitud de onda de 450 nm y con un filtro de referencia de 650 nm. Adicionalmente, la viabilidad de las células fue determinada con azul tripán.

Las células MCF-7 y PC-3 fueron sembradas a una concentración de 2,5 -  $5 \times 10^4$  células/pocillo en 100  $\mu$ l de medio de cultivo en platos de 96 pocillos y fondo plano (Linbro, Flow Laboratories, VA, USA) y se les permitió adherirse durante 24 h. Se añadieron diferentes concentraciones del lupeol y la casearina G (0-242  $\mu$ M) en 100  $\mu$ l de medio de cultivo. Se prepararon pocillos de control que contenían cantidades equivalentes de DMSO, las cuales no excedieron 1%. No se observó ningún efecto debido al DMSO. Después de 48 h de incubación a 37°C, el número de células viables fue medido usando el ensayo cromogénico

5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetilthiazolil)-3-(4-sulfofenil) (MTS)/PMS y el ensayo de sulforodamina B (Promega Corp., USA) para ello se siguieron las instrucciones del fabricante. En el caso del ensayo con MTS se determinó la CL<sub>50</sub>; concentración inhibitoria de 50% de la viabilidad celular total sin distinguir entre citostasis y citotoxicidad. En el caso del ensayo de sulforodamina B, se midió la densidad celular a T = 0 y después de 48 h. Esto permitió calcular tres parámetros, IC<sub>50</sub>; la concentración de la droga que inhibió el crecimiento de las células en 50%, ITC: la concentración de la droga que inhibió el crecimiento de las células en 100% y CL<sub>50</sub>; la concentración de la droga que indujo 50 % de citotoxicidad.

#### **Ensayo de fagocitosis**

Se evaluó el efecto de los compuestos utilizando muestras de sangre completa de ocho voluntarios aparentemente sanos. Para ello, 125  $\mu$ l de sangre venosa completa heparinizada fue tratada por triplicado con el lupeol y la casearina G a concentraciones finales de 2, 5 y 7 mM durante una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se agregaron 125  $\mu$ l de suspensión de *Bacillus subtilis* ( $1 \times 10^9$  UFC/ml) inactivada previamente durante 1 h a 80°C. Las muestras fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 30 min. Luego se prepararon extendidos en portaobjetos y se procedió a teñirlos con tinción de Wright. Las placas fueron observadas al microscopio para determinar la actividad fagocítica (porcentaje de monocitos/macrófagos fagocíticos) y el índice fagocítico (cantidad promedio de bacterias fagocitadas por los monocitos/macrófagos).

#### **Medición de óxido nítrico (NO)**

Monocitos/macrófagos tratados y no tratados con diferentes concentraciones del lupeol y la casearina G (0-72  $\mu$ M) fueron estimulados con 50  $\mu$ l de endotoxina bacteriana (1  $\mu$ g/ml) y fueron incubados a 37°C durante 24 h. Posteriormente, se transfirieron 100  $\mu$ l de sobrenadante de cada pocillo a otra placa similar y se agregó igual volumen de reactivo de Griess (1% de sulfanilamida, Sigma, y 0,1% de naftilenediamina, Sigma, disuelto en ácido fosfórico al 5%). Luego se determinó la absorbancia a 550 nm de cada uno de los pocillos de prueba y de los controles, utilizando un lector de microplacas. La concentración de NO se determinó por extrapolación en una curva ajustada, por el método de mínimos cuadrados que fue diseñada con un patrón de nitrito de sodio, en donde la

absorbancia está directamente relacionada con la cantidad de NO producido<sup>10</sup>.

### Fragilidad eritrocitaria

Diez microlitros de eritrocitos humanos lavados previamente con PBS a 2.000 rpm por 5 min, fueron mezclados por duplicado con 190  $\mu$ l del lupeol y la casearina G a diferentes concentraciones (0-950  $\mu$ M) en tubos tipo Eppendorf. Luego de 2 h, los tubos fueron centrifugados a 2.000 rpm por 5 min y 100  $\mu$ l de cada sobrenadante fue transferido a una placa de 96 pocillos fondo plano y la absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de microplacas. El experimento incluyó controles con 0,2% de DMSO, agua destilada y PBS. El porcentaje de hemólisis fue calculado de la manera siguiente:

$$\frac{\text{Absorbancia de eritrocitos con compuesto/}}{\text{Absorbancia de eritrocitos con H}_2\text{O dest. x 100}}$$

La viabilidad eritrocitaria fue calculada restando de 100 el porcentaje de hemólisis.

### Análisis estadístico

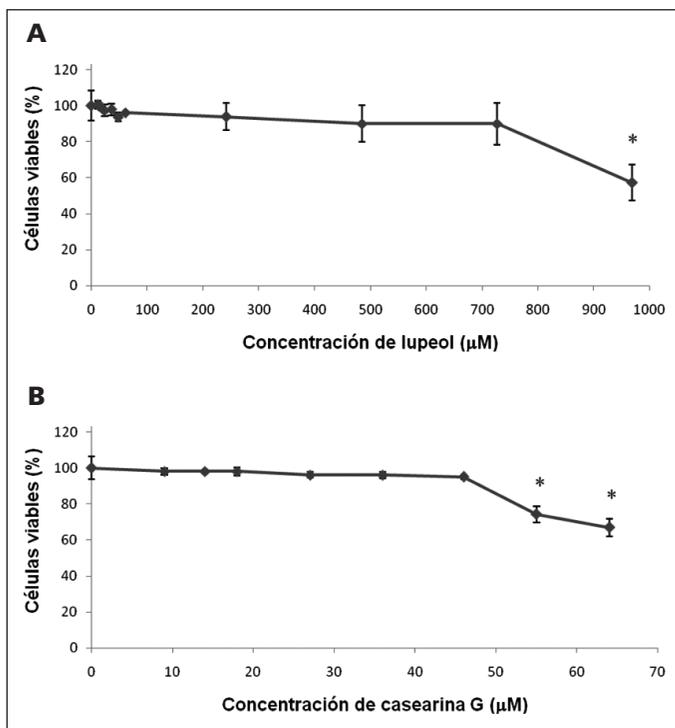
Los datos fueron evaluados por medio de un análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se

presentan como el promedio de cada tratamiento y de los controles  $\pm$  la desviación estándar.  $P < 0,05$  fue considerado como nivel de significancia estadística.

### Resultados

La cantidad de CMSP vivas disminuyó ( $p < 0,05$ ) cuando la concentración del lupeol se incrementó a 969  $\mu$ M y la casearina G se incrementó a  $\geq 55$   $\mu$ M (Figura 2). Por debajo de estas concentraciones no se observaron efectos citotóxicos sobre las CMSP. Las concentraciones del lupeol y la casearina G utilizadas en los ensayos inmunológicos estuvieron muy por debajo de las concentraciones citotóxicas determinadas en esta investigación.

Se observó una disminución ( $p < 0,01$ ) de la actividad fagocítica en las muestras tratadas con el lupeol ( $\geq 2$  mM), sin embargo, no se observó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en las muestras tratadas con la casearina G (Figura 3A). Además, se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del índice fagocítico luego del tratamiento con el lupeol ( $\geq 2$  mM,  $p < 0,01$ ) pero no se observó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) luego del trata-



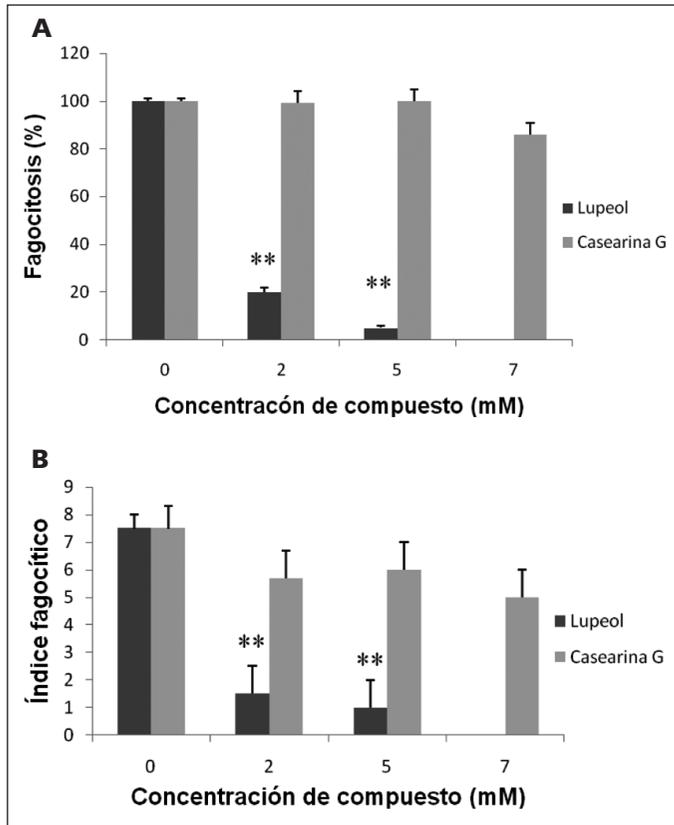
**Figura 2.** Efecto de **A.** lupeol y **B.** casearina G sobre la viabilidad de CMSP humana. Las células fueron cultivadas en ausencia y en presencia de lupeol (0- 969  $\mu$ M) y casearina G (0-64  $\mu$ M) durante 72 h. El porcentaje de células vivas fue determinado con azul tripán. A concentraciones de 969  $\mu$ M de lupeol y  $\geq 55$   $\mu$ M de casearina G, se observó una disminución de la cantidad de células viables ( $p < 0,05$ ) con respecto a 0  $\mu$ M de compuesto. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE de cinco réplicas.

miento con la casearina G en comparación con el control (Figura 3B).

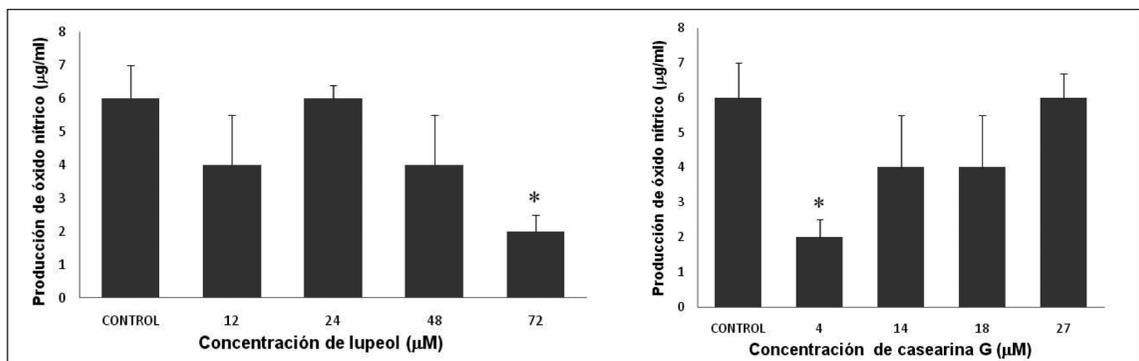
Se observó una disminución ( $p < 0,05$ ) de la producción de NO en las muestras tratadas con el lupeol (72  $\mu\text{M}$ ) y la casearina G (4  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4).

La viabilidad eritrocitaria disminuyó ( $p < 0,05$ ) en las muestras tratadas con la casearina G ( $\geq 182 \mu\text{M}$ ) (Figura 5).

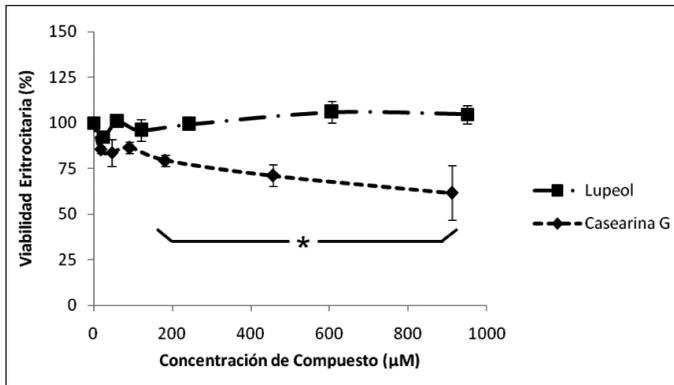
Los ensayos de citotoxicidad con casearina G sobre células tumorales PC-3 arrojaron valores de



**Figura 3.** Efecto *in vitro* de lupeol y casearina G sobre **A.** el porcentaje de fagocitosis y **B.** el índice fagocítico. Sangre completa humana tratada y no tratada con lupeol y casearina G (0-7 mM) fue incubada con *Bacillus subtilis*, en **A.** se contabilizó el número de células con bacterias en su interior, en **B.** se contabilizó el número de bacterias fagocitadas por célula. El porcentaje de células fagocíticas y el índice fagocítico disminuyeron ( $p < 0,01$ ) en las muestras tratadas con lupeol ( $\geq 2$  mM) con respecto a 0 mM de compuesto. Cada columna representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas.



**Figura 4.** Efecto *in vitro* de **A.** Lupeol y **B.** Casearina G sobre la producción de óxido nítrico por monocitos/macrófagos activados. Las células fueron cultivadas con lupeol (0-72  $\mu\text{M}$ ) y casearina G (0-27  $\mu\text{M}$ ), durante 72 h. A concentraciones de lupeol de 72  $\mu\text{M}$  y casearina G de 4  $\mu\text{M}$ , los monocitos/macrófagos disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) la producción de óxido nítrico con respecto al control activado (0  $\mu\text{M}$  de compuesto). Cada barra representa el promedio  $\pm$  DE de tres réplicas.



**Figura 5.** Efecto *in vitro* de lupeol y casearina G sobre la viabilidad eritrocitaria. Los eritrocitos humanos tratados y no tratados con lupeol y casearina G (0-950 µM) fueron incubados durante 2 h y se midió la absorbancia de la hemoglobina liberada en el sobrenadante. La viabilidad eritrocitaria disminuyó ( $p < 0,05$ ) en las muestras tratadas con casearina G ( $\geq 182 \mu\text{M}$ ) con respecto a 0 µM de compuesto. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE de dos réplicas.

$CI_{50} = 12,5 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} = 13,3 \mu\text{M}$  y  $CL_{50} = 51,9 \mu\text{M}$  mientras que el efecto citotóxico de la casearina G sobre las células tumorales MCF-7 se evidenció por una  $CI_{50} = 112,8 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50} = 11,8 \mu\text{M}$  y  $CL_{50} = 49,4 \mu\text{M}$ . No se observó efecto citotóxico del lupeol sobre las células PC-3 y MCF-7 (Tablas 1 y 2).

## Discusión

Los monocitos/macrófagos juegan un papel importante en muchas condiciones patológicas, incluyendo cáncer, trastornos inflamatorios, infecciosos y autoinmunes<sup>14</sup>. La actividad fagocítica en sangre completa constituye un modelo que asemeja un potencial escenario terapéutico, por lo que decidimos utilizar este tipo de ensayo para evaluar el efecto del lupeol y la casearina G sobre la actividad fagocítica de monocitos/macrófagos. El hecho de que nuestros resultados muestren que el lupeol causó la disminución tanto del porcentaje de monocitos/macrófagos fagocíticos como del índice fagocítico sugiere que el lupeol pudiera estar

inhibiendo la fagocitosis *per se* y/o el reclutamiento de monocitos/macrófagos. La utilización de otros métodos (e.g. marcadores de superficie celular, citometría de flujo) podría contribuir a descartar los posibles sesgos originados por la evaluación microscópica de la morfología de las células estudiadas. Varios investigadores han reportado que el lupeol es capaz de reducir la fagocitosis en

**Tabla 1. Efecto citotóxico de lupeol y casearina G sobre células PC-3 y MCF-7, medido por el método de MTS/PMS, después de 48 h de incubación. N = 3**

Compuestos	Líneas celulares	
	PC-3 $CI_{50}$	MCF-7 $CI_{50}$
Lupeol	> 242	> 242
Casearina G	12,5	112,8

PC-3: cáncer de próstata humano. MCF-7: adenocarcinoma de mama humano.  $CI_{50}$ : concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular total sin distinguir entre citostasis y citotoxicidad. Concentraciones expresadas en µM.

**Tabla 2. Efecto citotóxico y citostático de lupeol y casearina G sobre células PC-3 y MCF-7, medido por el método de sulfurodamina B, después de 48 h de incubación. N = 3**

Compuestos	$IC_{50}$	Líneas celulares				
		PC-3 ITC	PC-3 $CL_{50}$	MCF-7 $IC_{50}$	MCF-7 ITC	MCF-7 $CL_{50}$
Lupeol	> 242	> 242	> 242	> 242	> 242	> 242
Casearina G	13,3	28,7	51,9	11,8	22,8	49,4

PC-3: cáncer de próstata humano. MCF-7: adenocarcinoma de mama humano.  $IC_{50}$ : concentración de la droga que inhibió el crecimiento de las células en un 50%, ITC: concentración de la droga que inhibió el crecimiento de las células en un 100%,  $CL_{50}$ : concentración de la droga que indujo 50 % de citotoxicidad. Concentraciones expresadas en µM.

otros modelos experimentales<sup>1,2</sup>. El lupeol puede interactuar con múltiples moléculas, afectando y modulando el proceso inflamatorio y la respuesta al estrés celular, además, ha mostrado baja citotoxicidad en células sanas y actúa sinérgicamente cuando se utiliza en terapias combinadas<sup>1</sup>.

La disminución de la producción de NO causada por el lupeol en nuestros experimentos es consistente con lo reportado por otros investigadores, el acetato de lupeol causó la disminución del número de células que poseen actividad de la sintasa de NO inducida (iNOS), lo que sugiere la participación del sistema del NO en la acción de este compuesto<sup>15</sup>.

También ha sido reportado que extractos de *C. sylvestris* inhiben muy poco la producción de NO<sup>16</sup>. En efecto, nosotros encontramos que sólo la concentración de 4  $\mu\text{M}$  de casearina G causó disminución de la producción de NO mientras que concentraciones más altas de casearina G no tuvieron efecto sobre la producción de NO.

*C. sylvestris* es una planta utilizada por indígenas de América del Sur para el tratamiento de varias enfermedades, incluyendo cáncer<sup>8</sup>. Nuestros resultados podrían explicar, al menos en parte, las propiedades antitumorales que se le atribuyen a esta planta (pues la casearina G es, según datos aún no publicados, el diterpeno tipo clerodano más abundante en esta planta), toda vez que la casearina G mostró efecto citotóxico y citostático *in vitro* contra células tumorales PC-3 y MCF-7. Estudios previos de citotoxicidad muestran que la  $\text{CD}_{50}$  (que en nuestro artículo se define como  $\text{IC}_{50}$ ) del aceite de *C. sylvestris* para las células tumorales HeLa, A-549 y HT-29 es 63,3, 60,7 y 90,6  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente<sup>8</sup>. También reportamos que la  $\text{IC}_{50}$  de la casearina G para las células tumorales PC-3 y MCF-7 es 13,3 y 11,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Las diferencias observadas pueden deberse a que nosotros utilizamos casearina G pura mientras que otros estudios utilizaron un extracto oleoso de *C. sylvestris*. Se ha reportado que la  $\text{CD}_{50}$  del aceite de *C. sylvestris* para las células Vero es 210,1  $\mu\text{g/ml}$  y para los macrófagos murinos es 234,0  $\mu\text{g/ml}$ <sup>18</sup>, nuestros resultados muestran que las concentraciones de casearina G requeridas para disminuir la viabilidad de CMSP y eritrocitos *in vitro* en 50% fue  $> 64$  y  $> 911 \mu\text{M}$ , respectivamente.

La máxima concentración que no causó hemólisis de eritrocitos humanos *in vitro* en el caso del aceite de *C. sylvestris* fue 156,2  $\mu\text{g/ml}$ <sup>18</sup> mientras

que para la casearina G fue 91  $\mu\text{M}$ . El hecho de que altas concentraciones de la casearina G causaron hemólisis de eritrocitos humanos *in vitro*, sugiere que este compuesto podría ser responsable del efecto hemolítico del aceite de *C. sylvestris* descrito por otros autores<sup>8</sup>.

Otros estudios fitoquímicos con *C. sylvestris* han revelado la presencia de casearinas y casearvestrinas, que exhiben actividad citotóxica. Varios compuestos de este tipo poseen una configuración *cis* o *trans* entre los anillos A y B y más importante, un característico sistema diacetal en el anillo C en las posiciones C-18 y C-19<sup>6,7</sup>, lo que posiblemente les otorga a estos sus propiedades citotóxicas.

En esta investigación, el lupeol mostró muy poco efecto sobre las células tumorales estudiadas en comparación con lo reportado por otros investigadores<sup>17,18</sup> que utilizaron concentraciones mucho más altas<sup>18</sup> o compuestos estructuralmente diferentes<sup>17</sup> al lupeol utilizado en nuestro trabajo.

En conclusión, el lupeol causa disminución de la actividad fagocítica y la casearina G tiene efecto citotóxico sobre las células tumorales PC-3 y MCF-7. Estos compuestos podrían ser útiles en el desarrollo de fármacos antiinflamatorios mientras que la casearina G podría utilizarse para el desarrollo de fármacos antitumorales.

**Agradecimientos:** Agradecemos a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) de Panamá por financiar esta investigación como parte del proyecto código FID09-002.

## Referencias

1. Gallo MBC, Sarachine MJ. Biological activities of lupeol. *Int J Bio Pharma Sci* 2009; 3: 46-66.
2. Bani S, Kaul A, Khan B, Ahmad SF, Suri KA, Gupta BD et al. Suppression of T lymphocyte activity by lupeol isolated from *Crataeva religiosa*. *Phytother Res* 2006; 20: 279-87.
3. Moreira RRD, Carlos IZ, Vilegas W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 201-4.
4. Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol* 2000; 127: 21-30.

5. Sertié JAA, Carvalho JCT, Panizza S. Antiulcer activity of crude extracts from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharm Biol* 2000; 38: 112-9.
6. Oberlies NH, Burgess JP, Navarro HA, Pinos RE, Fairchild CR, Peterson RW, et al. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J Nat Prod* 2002; 65: 95-9.
7. Carvalho PRF, Furlan M, Young MCM, Kingston DGI, Bolzani VS. Acetylated DNA-damaging clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. *Phytochem* 1998; 49: 1659-62.
8. Da Silva SL, Chaar J, Figueiredo P, Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. *Acta Amaz* 2008; 38 (1): 107-12.
9. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4 (4): 221-33.
10. Dupuy OA, Murillo R, Bonilla JA. Actividad supresora del millerenólido sobre células mononucleares de sangre periférica humana. *Rev Med Chile* 2008; 136: 64-72.
11. Dupuy OA, Murillo R, Bonilla JA. Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *Viguiera sylvatica* y *Decachaeta thieleana* (Asteraceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW. *Rev Biol Trop* 2008 b; 56 (3): 1063-73.
12. Taylor PG, Dupuy OA, Bonilla JA, Murillo R. Anticancer activities of two sesquiterpene lactones, millerenolide and thieleanin isolated from *Viguiera sylvatica* and *Decachaeta thieleana*. *Fitoterapia* 2008; 79: 428-32.
13. Rodríguez-Guzmán R, Fulks LC, Radwan MM, Burandt CL, Ross SA. Chemical constituents, antimicrobial and antimalarial activities of *Zanthoxylum monophyllum*. *Planta Med* 2011; 77 (13): 1542-4.
14. Ross JA, Auger MJ. The biology of the macrophage. In: Burke B, Lewis CE, Editors, *The Macrophage*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2002. p. 3-72.
15. Lucetti DL, Lucetti ECP, Bandeira MAM, Veras HNH, Silva AH, Leal LKAM, et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *J Inflamm* 2010; 7: 60-70.
16. Napolitano DR, Mineo JR, de Souza MA, de Paula JE, Espindola LS, Espindola FS. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *J Ethnopharmacol* 2005; 99 (1): 37-41.
17. Puapairoj P, Naengchomnong W, Kijjoa A, Pinto MM, Pedro M, Nascimento MS, et al. Cytotoxic activity of lupane-type triterpenes from *Glochidion sphaerogynum* and *Glochidion eriocarpum* two of which induce apoptosis. *Planta Med* 2005; 71 (3): 208-13.
18. Prasad S, Nigam N, Kalra N, Shukla Y. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Mol Carcinog* 2008; 47 (12): 916-24.