

Efecto de un extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* sobre los niveles de poliaminas de intestino y riñón en el modelo de linfoma murino L5178Y

Effect of a hydroalcoholic extract of *Bursera fagaroides* on intestinal and kidney polyamine levels in the murine lymphoma model L5178Y

REYNOSO-OROZCO, Ramón*†, SANTERRE, Anne, PUEBLA-PÉREZ, Ana María y NOA-PÉREZ Mario

Universidad de Guadalajara, Departamento de Biología Celular y Molecular-CUCBA, Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, 44600 Zapopan, Jal.

ID 1^{er} Autor: Ramón, Reynoso-Orozco / ORC ID: 0000-0002-2072-8192, CVU CONACYT ID: 35383

ID 1^{er} Coautor: Anne, Santerre / ORC ID: 0000-0003-2460-9630, CVU CONACYT ID: 20727

ID 2^{do} Coautor: Ana María, Puebla-Pérez / ORC ID: 0000-0001-5133-1975, CVU CONACYT ID: 21328

ID 3^{er} Coautor: Mario, Noa-Pérez / ORC ID: 0000-0001-5929-2296, CVU CONACYT ID: 120611

Recibido Enero 14, 2018; Aceptado Marzo 04, 2018

Resumen

Las poliaminas (PAs), Putrescina (Pu), Espermidina (Spd) y espermina (Spm) son alquilaminas poliacatiónicas indispensables para el crecimiento y diferenciación celular. En adición a su síntesis de novo, las células pueden incorporar PAs de fuentes extracelulares, como tejido canceroso, el alimento, y la microbiota intestinal. Sin embargo, se requiere de más estudios que permitan dilucidar la distribución y el flujo de las mismas, tanto en tejido normal como en el fenómeno del cáncer. En el modelo de linfoma murino L5178Y, el nivel de PAs intestinales disminuyó en presencia de tumor más el tratamiento con *Bursera fagaroides* pero no en sanos con tratamiento. En el riñón los niveles de PAs aumentan en los ratones con linfoma y aquellos que no tenían tumor. Probablemente y dado que las células intestinales se están dividiendo rápidamente y las células renales no, esto puede ser una prueba que las PAs son necesarias para mantener el crecimiento tumoral. Con el fin de dilucidar la distribución y el papel de las PAs en el organismo. El modelo de linfoma murino L5178Y es muy utilizado en estudios inmunológicos. En particular, para probar *in vivo* la actividad antitumoral de sustancias de origen natural.

Poliaminas, L5178Y in vivo, Riñón, Intestino, Derivatización postcolumna

Abstract

The polyamines (PAs), Putrescine (Pu), spermidine (Spd) and spermine (Spm) are naturally occurring polycationic alkilamines that are indispensable for growth and cellular differentiation. In addition to their de novo synthesis, cells can incorporate PAs from extracellular sources, such as cancerous tissue, food, and intestinal microbiota. However, more studies are required to elucidate the distribution and flow of these, both in normal tissue and in the cancer phenomenon. In the murine lymphoma model L5178Y the level of intestinal PAs were diminished in presence of tumor plus *Bursera fagaroides* treatment borden but not in its absence. Interestingly, the levels of PAs increase in the kidney of mice with lymphoma and those were tumor free since intestinal cells are rapidly dividing and renal cells are not this may be proof the PAs are necessary to maintain cellular growth. In order to elucidate the distribution and role of PAs in the cell. The L5178Y murine lymphoma model is widely used in immunological studies. In particular, to test *in vivo* the antitumor activity of substances of natural origin.

Polyamines, L5178Y in vivo, kidney, intestine, post-column Derivatization

Citación: REYNOSO-OROZCO, Ramón, SANTERRE, Anne, PUEBLA-PÉREZ, Ana María y NOA-PÉREZ Mario. Efecto de un extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* sobre los niveles de poliaminas de intestino y riñón en el modelo de linfoma murino L5178Y. Revista de Ciencias de la Salud. 2018. 5-14: 1-8.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: ramón.reynoso@academicos.udg.mx)

† Investigador contribuyendo como primer Autor

Introducción

Las poliaminas (PAs) son cationes orgánicos de peso molecular bajo, esenciales para el crecimiento y la diferenciación celular (Kobayashi, 2003). Todos los sistemas biológicos contienen las PAs consideradas clásicas en los sistemas biológicos, como son: Espermidina (Spd), Espermina (Spm) y su precursor Putrescina (Pu), son las principales PAs en los tejidos de mamíferos. Sin embargo muy poco se sabe sobre la contribución de varios órganos a las concentraciones extracelulares de las mismas.

La recuperación significativa de PAs marcadas con radioisótopos en humanos (Rosenblum, 1978) y en modelos animales son excelentes marcadores para describir varios eventos celulares, y muestran en el riñón un nivel alto de Spm y bajo en Pu, ésta última, se absorbe casi totalmente por el intestino donde se utiliza para producir energía. La Spd se encuentra a nivel medio y no se excreta por el riñón (Kobayashi, 2003). Su control celular tiene cuatro mecanismos diferentes: síntesis de novo, de interconversión, degradación terminal y su transporte (Urdiales, 2001). El transporte de PAs hacia el citoplasma de las células epiteliales es dependiente del contenido intestinal de las mismas en el lumen (Uemura, 2011). Las PAs dietarias son absorbidas completamente y representan una fuente importante para el metabolismo. El intestino las absorbe y pasan a la circulación sistémica, para de ahí ser dirigidas hacia tejidos y órganos que han sido estimulados para crecer debido a señales metabólicas (Jeevanadam, 2001).

En muchos vertebrados la maduración del intestino y del tracto digestivo en general requiere de las PAs, esenciales para que el organismo se adapte específicamente a alimentos nuevos u antígenos (Sabater-Molina, 2011). La maduración del intestino, hígado y páncreas se logra a partir de la Spm administrada oralmente (Deloyer, 2001). Los resultados obtenidos por el grupo de Bardocz (Pryme, 1994) sugieren que el crecimiento inducido del epitelio intestinal, puede funcionar como un competidor efectivo en la captación de PAs exógenas, que son necesarias para el tumor, lo que reduce la disponibilidad de las mismas y disminuye el crecimiento tumoral (Pryme, 1994).

Los resultados sugieren que hay una competencia por la PAs entre el tumor y los órganos, lo cual permite manipular el metabolismo del ratón con tumor y desarrollar nuevas estrategias antitumorales (Pryme y Bardocz, 2001).

Por otro lado, la determinación de los niveles de PAs como compuestos con estructura similar requieren separación selectiva y se prueban técnicas cromatográficas, electroforéticas, radioinmunológicas, así como enzimáticas. De éstas, los procedimientos cromatográficos son atractivos y los más utilizados por las innovaciones en materiales y equipos, sus detectores y la posibilidad de automatizar todo el proceso (Khuhawar, 2001).

Es importante ponderar las ventajas y desventajas de todos y cada una de las técnicas y su mejor aplicación. El presente trabajo utiliza la modalidad de intercambio iónico con derivatización postcolumna, dados los beneficios que representa sobre el método de extracción respecto a otras técnicas.

En el modelo de linfoma murino L5178Y, el cual es muy utilizado en estudios inmunológicos en particular para probar *in vivo* (Reynoso-Orozco, 2008; Preza, 2010; Paniagua-Domínguez, 2008), la actividad antitumoral de sustancias de origen natural, como *Bursera fagaroides* (Puebla-Pérez, 1998), y sintético como los análogos de PAs. Evaluar los niveles de PAs en el riñón e intestino permitirá avanzar en el estudio del metabolismo en general y su participación en el fenómeno del cáncer.

Materiales y Métodos

Grupos de animales

Se formaron 6 grupos de ratones BALB/c (haplotipo H-2^d), 6 semanas de edad, 20-24 g de peso. Fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio con agua y alimento *ad libitum*, con 5 ratones cada grupo. Tres grupos de sanos y tres grupos de animales con tumor de los cuales 4 grupos recibieron extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* a razón de 100 mg/Kg. de peso por día ya sea oral o intraperitonealmente (i.p.) durante 15 días y sus grupos control y testigo, respectivamente.

Obtención de tejidos

A todos los animales se extirpó el intestino delgado, así como el riñón y a éste último se le retiró un trozo de tejido para análisis cromatográfico a los 17 días de evolución del tumor.

Material Biológico

Se utilizaron ratones singénicos BALB/c (haplotipo H-2^d) machos de 6 a 8 semanas de edad, alojados en jaulas de policarbonato. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura controlada de 22°C y ciclos alternos de iluminación-oscuridad de 12 h, alimentados con una dieta balanceada especial para roedores y agua purificada para consumo voluntario. El experimento se realizó según los lineamientos de la Ley General de Salud de la República Mexicana y los establecidos de la “Guide for the care and use of laboratory animals”.

Células tumorales

Se utilizó como modelo el linfoma murino L5178Y, el cual es un tumor tímico (haplotipo H-2^d) de origen inducido con ésteres de forbol. Se conservó por trasplante i.p. semanalmente en ratones BALB/c que son compatibles con el locus H-2^d de los ratones DBA/2. El tumor es de alta malignidad ya que 20X10⁶ células L5178Y inoculadas por vía i.p. mata a los ratones en 15 ± 2 días.

Obtención de Intestino

A cada ratón se le extirpó el intestino delgado. Se mezcló el tejido en TCA 5N-HCl al 0.05% y se homogeneizaron mecánicamente en mortero, se centrifugaron a 10,000 rpm 20 min y se almacenaron a -80°C. Al sobrenadante se le adicionó como estándar interno (1,7 Díaminoheptano) para su análisis cromatográfico.

Obtención del Riñón

Se extirpó el riñón del lado derecho y se obtuvo una porción que se pesó. Se mezcló con 1 ml de TCA 5N-HCl al 0.05% por mg de tejido, se homogeneizó con mortero y se centrifugó a 10,000 rpm, durante 20 min, el sobrenadante se congeló a -80°C y se adicionó el estándar interno (1,7 Díaminoheptano) para su análisis cromatográfico.

Sistema Cromatográfico de Intercambio Iónico

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA. El análisis cromatográfico se realizó según el método desarrollado por Villanueva et al., (1986), donde se utilizó una resina de intercambio catiónico BC X-12 (Benson Co, Reno, Nevada, USA.) empacada en una columna de vidrio (0.4 cm de diámetro interno por 9 cm de altura) mantenida a 74°C. Se utilizó un sistema de dos amortiguadores (ver cuadro 8), basados en citrato de litio, los cuales se utilizan en secuencia por medio de una bomba reciprocante a 33 mL/h de flujo. Los amortiguadores fueron filtrados en membranas de 0.45 µm de diámetro de poro (Millipore corporation, Bedford, MA, USA).

	Tiempo	Citrato de Litio	KCl	H ₃ BO ₃	pH	Etanol	Ácido Caprílico
Amortiguador I	30 min	0.4N	0.12N	0.3N	8.45	2.5%	100 µl
Amortiguador II	50 min	0.6N	2.0N	-	6.10*	5.5%	-

*El pH fue modificado del método original utilizado por Villanueva et al. (1986), con el fin de obtener una buena separación de las PAs en el cromatograma, encontrando el indicado en este caso de pH = 6.10 (reactivos de Merck, Darmstadt, Alemania).

Tabla 1 Componentes de los amortiguadores (fase móvil)

Al final del ciclo, la columna se lavó durante 10 min, con una solución de Hidróxido de Litio (LiOH) 0.3 N, KCL 0.2 N y EDTA 100 mg/L. La columna se reequilibró con amortiguador I durante 10 min.

La detección post-columna se realizó con: ortoftaldehído (OPA) (Sigma Chemical, San Luis, Missouri) como derivatizante, preparado con 800 mg de OPA en 10 mL de etanol y 2 mL de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical, San Luis, Missouri). Esta mezcla se llevó a un litro de ácido bórico (0.4 M, ajustando pH a 10.4 con hidróxido de sodio) y se le adicionó 3 mL de Brij 35 (Merck, Darmstadt, Alemania) al 30%. Se utilizó un detector de fluorescencia (Shimatzu modelo RF-530) con una longitud de onda de excitación de 345 nm y una longitud de onda de emisión a 455 nm, el derivatizante fluye por medio de una bomba a 15 ml/h. El estándar interno utilizado fue el 1,7-diaminoheptano (DAH) (Sigma Chemical, San Luis, Missouri).

En estas condiciones el primer amortiguador eluye los precursores ornitina, tiempo de retención 8.86 min y arginina TR 19.10; el segundo amortiguador eluye a la ¹Pu TR 39.29, la ²Spd TR 46.70, la ³Spm TR 60.00 y al estándar interno 1,7-diaminoheptano TR 68.88.

1 Estándares putrescina y espididina (Sigma, San Luis Missouri). 2 Estándar espermina (Merck, Darmstadt, Alemania).

Los cromatogramas se obtuvieron por medio del integrador Spectra-Physics SP 4290. Para determinar los niveles de PAs se utilizó una curva de regresión lineal en la calibración.

Mediante un programador diseñado por Villanueva y Adlakha, 1978, se le aplicó al sistema cromatográfico el siguiente ciclo:

Línea	Tiempo minutos	Amortiguador I	Amortiguador II	Reactivo Derivatizante OPA*	LiOH
00	10				
01	10				
02	20				
03	50				
04	11				

*ortoftalaldehído

Tabla 2 Ciclo programado al sistema cromatográfico. FALTA LiOH. El Tiempo de corrida se estableció en 80 min.

Niveles de PAs y Análisis Cromatográfico

La separación de las PAs se realizó según la técnica descrita por Villanueva y cols. 1987 con las modificaciones siguientes: La segunda solución (solución II) de citratos ($C_6H_5Li_3O_7$ 0.6 N + KCl 2 N) con 5.5% etanol y pH final 6.1 se inyectó durante 60 min, eluye a Pu, Spd y Spm; se lavó durante 11 mins con una solución de LiOH 0.3 N para reutilizar la columna en un nuevo análisis. La columna se reequilibró con el paso de solución I durante 10 min. Los resultados se expresan por concentración en picomoles de PAs por mg de tejido.

Parámetros Cromatográficos

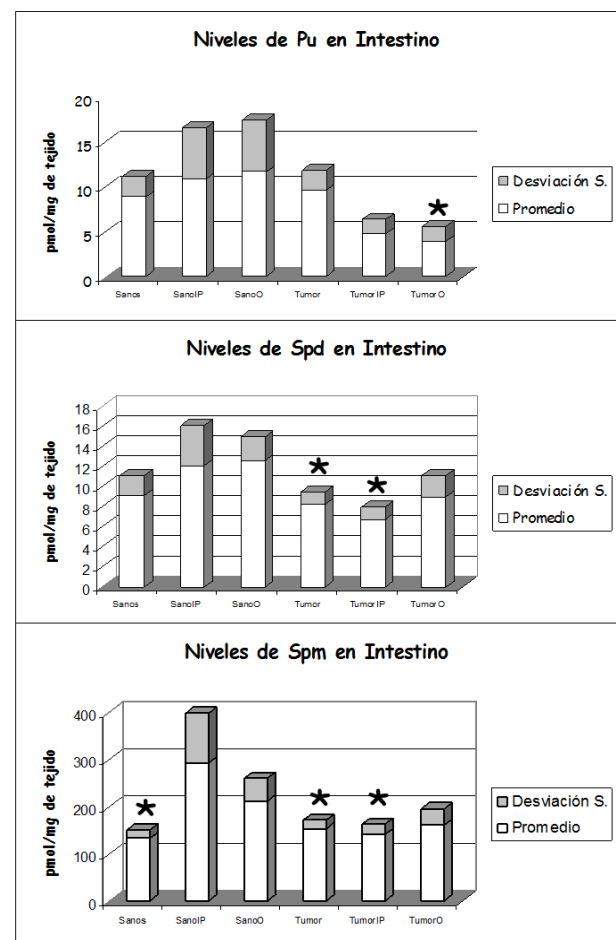
Se utilizó un analizador automático con dos bombas de flujo continuo y controlado, Detector de fluorescencia (Shimatzu) y muestreador automático con espiral de 100 μ l de volumen (Spectraphysics), en el cual se analizaron, por duplicado, todas las muestras biológicas.

Análisis Estadístico

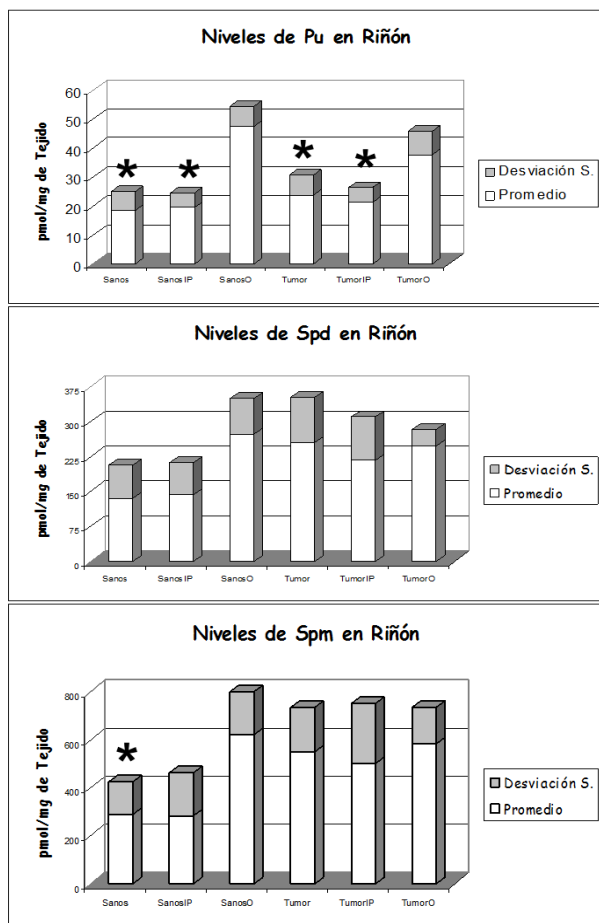
Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para pruebas pareadas y la prueba de Student Newman Keules para comparar las medias con el paquete estadístico Sigma Stat 11.

Resultados y Discusión

La gráfica 1 muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de las PAs en intestino. La Spm es la molécula que se encuentra en mayor concentración. Con respecto al grupo de ratones sanos y con tumor la cual se considera la PA más importante, biológicamente activa.



Gráfica 1 Niveles de PAs en intestino de ratones sanos y tratados con extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* a razón de 100 mg/Kg, así como su contraparte de ratones con tumor L5178Y, tratados de la misma manera



Gráfica 2 Niveles de PAs en riñón de ratones sanos y tratados con extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* a razón de 100 mg/Kg, así como su contraparte de ratones con tumor L5178Y, tratados de la misma manera

Aquí también se puede apreciar que en ratones con tumor hay una mayor elevación de PAs con respecto a los ratones sanos, lo cual es de esperarse ya que como se ha dicho anteriormente, las PAs juegan un papel importante en la proliferación tumoral. En el riñón también el tratamiento disminuyó la concentración de PAs. En el grupo con tumor parece ser la aplicación del extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* via i.p. la inductora de dicho resultado, pero no la vía oral. También es evidente que la Spm es la PA de mayor concentración en el riñón (Gráfica 2).

En el presente trabajo se estandarizó la técnica cromatográfica bajo el principio de intercambio iónico, para determinar los niveles de PAs en el riñón e intestino de ratones BALB/c y corresponde a la continuación de trabajos previos (Preza, 2010; Puebla-Pérez, 1998; Reynoso-Orozco, 2004 y 2008; Sandoval-Salazar, 2004; Paniagua-Domínguez, 2008) cuyo objetivo general es la determinación de los niveles de PAs en células, tejidos y fluidos en el mismo modelo de linfoma murino L5178Y.

Es importante mencionar que la presente línea de investigación en sus inicios trata de establecer a las PAs como bioindicadores del desarrollo neoplásico (Reynoso-Orozco, 2008) y que además se validó la prueba analítica (Delgado-Saucedo, 2003) como tal. Otro objetivo del proyecto en extenso es determinar la actividad de la enzima limitante de la síntesis de las PAs, la ODC, y dadas sus características de expresión diferencial en órganos, se estudió dicha actividad en intestino y en el riñón de estos roedores (Reynoso-Orozco, 2008).

Para fortalecer el conocimiento bioquímico de las PAs en estos órganos, es necesaria la determinación de sus niveles. Otra parte importante de esta línea de investigación es estudiar el efecto sobre el metabolismo de las PAs en tratamientos que inducen la regresión del tumor, tanto de origen natural como el extracto hidroalcohólico de *Bursera fagaroides* (Puebla-Pérez, 1998) como de origen sintético como es el caso de difluorometilornitina DFMO (Gerner, 2004).

El grupo de Pryme y Bradócz (2001) propone, y dados los resultados que ellos han obtenido en un modelo muy parecido al nuestro, con un linfoma no Hodking inoculado i.p., que existe una competencia por las PAs entre el tumor y los tejidos sanos para mantener viables a las células tumorales y probablemente su índice de proliferación (Pryme, 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios que determinen el patrón de distribución de las PAs en los distintos tejidos, células y órganos durante el crecimiento neoplásico (Jeevanandam, 2001).

El alcance del presente trabajo nos permite sentar las bases para iniciar el estudio de la bioquímica de las PAs en los órganos relacionados con las vías de administración de los fármacos. En el caso del mesotelio peritoneal, que ya fue estandarizado (Sandoval-Salazar, 2004) permite estudiar el efecto directo sobre estos tejidos; y en el caso del riñón nos permite estudiar el efecto a nivel sistémico de estos tratamientos sobre el metabolismo de las moléculas de interés.

La Pu es un elemento esencial pero no tan evidente en los órganos en estudio a diferencia de la Spd y la Spm que corresponden a las moléculas útiles y funcionales en la célula (Kobayashi, 2003).

Nuestros resultados confirman lo anterior, ya que las mayores concentraciones corresponden a las tri y tetraminas en los órganos de estudio. La estandarización de esta técnica (Villanueva, 1978), y quizás sea el último reporte con la misma, permite observar el aumento, casi al doble, en la concentración de Spd y Spm inducido por la presencia del tumor en riñón, más no así la Pu. La ventaja más importante del sistema de determinación, es que el proceso de extracción es sumamente sencillo y no requiere de purificaciones extenuantes, como el caso de HPLC, por ejemplo.

Kobayashi (2003) determinó los niveles de PAs en intestino, hígado y riñón en ratas inoculadas con células ascíticas (AH109A) tumorales, en asociación a las concentraciones incluidas en la dieta. En el intestino, los niveles de PAs fueron muy similares, de acuerdo con la noción de que hay un reservorio de PAs exógenos que son captadas por difusión pasiva hacia el intestino. En el riñón encontró altos niveles de Spm, seguido por la Spd y mínima cantidad de Pu. Se especula que, la Pu fue la PA que estuvo en menor cantidad, probablemente debido a que es degradada por las enzimas oxidadasas y utilizada para producir energía disponible inmediatamente y mantener el sistema funcionando. En el mismo órgano no se observan diferencias estadísticas significativas al comparar los niveles de PAs de ratones sanos y ratones a los 17 días de evolución del tumor. Probablemente realizando mediciones en momentos adecuados del crecimiento neoplásico, se podría probar la validez de la teoría del grupo de Pryme y Bardocz (2001).

Los resultados sugieren que en el intestino hay concentraciones bajas debido a que estas moléculas son aprovechadas al máximo en este órgano. Probablemente son transformadas en energía o metabolitos, e incluso como regeneradores de tejidos de la mucosa, tal como es Spm (Deloyer, 2001). Debido a las altas concentraciones de Spm, y por la competencia que puede haber con la Spd, por ejemplo para entrar en las células para su aprovechamiento (Guerner, 2003). Esta molécula debe ser eliminada para no causar efectos tóxicos, por lo cual el sistema de eliminación adecuado sería por el riñón, mismo que desecha esta molécula por la orina. En conjunto, contribuyen para entender la ruta bioquímica de las PAs, en particular Pu, Spd y Spm en riñón e intestino de ratones BALB/C con linfoma murino L5178Y.

El tratamiento de ratones sanos y con tumor, con el extracto de *Bursera fagaroides* no representó una disminución del tumor, de manera significativa en el momento de cohorte. Por el contrario en ratones sanos, parece influir en la elevación de Spm en intestino y riñón, lo que sugiere de más estudios al respecto.

Agradecimiento

Los autores del presente trabajo agradecemos profundamente la donación que amablemente proporcionó al laboratorio para la realización de éste y otros trabajos al Dr. Victor Raúl Villanueva[†]. El presente proyecto fue apoyado por el CONACyT y la Universidad de Guadalajara.

Conclusiones

En el riñón los niveles de PAs se encuentran altos para Spm, seguido por la Spd y mínima cantidad de Pu. Para el intestino hay concentraciones bajas de las tres PAs determinadas y los cambios en dichos niveles se ven alterados por la presencia del tumor, así como el tratamiento con *Bursera fagaroides*.

El tratamiento de ratones sanos y con tumor, con el extracto de *Bursera fagaroides* no representó una disminución del tumor, de manera significativa en el momento de cohorte del presente trabajo.

Referencias

- Delgado-Saucedo, J. I. (2003). Validación de un método de separación cromatográfica de poliaminas. 2003. Tesis de grado, Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara.
- Deloyer, P. (2001). Dietary Polyamines and Non-Neoplastic Growth and Disease. *European J of Gastroenterology & Hepatology*. 13(9): 1027-32.
- Gerner, E. W. and Meyskens, F. L. (2004). Polyamines and cancer. Old molecules, new understanding. *Nature Reviews*. 4:781-792.
- Gerner, E. W. (2007). Impact of dietary amino acids and polyamines on intestinal carcinogenesis and chemoprevention in mouse models. *Biochem Soc Trans*. 35(2): 322-325.

- Jeevanandam, M. and Petersen, R. (2001). Clinical Role of Polyamine analysis: problem and promise. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic care*. 4:385-390.
- Kuhawar, M. Y. and Qureshi, G. A. (2001). Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J Chrom B*. 764: 385-407.
- Kobayashi, M., Xu, Y. J., Samejima, K., Goda, H., Niitsu, M., Takahashi, M., and Hashimoto, Y. (2003). Fate of orally administered ¹⁵N-labeled polyamines in rats bearing solid tumors. *Biol Pharm Bull*. 26(3):285-8.
- Paniagua-Domínguez, B. L., Peregrina-Sandoval, J., Velázquez-Magaña, S., Flores-Torales, E. and Orozco-Barocio, A. (2008). Valoración de la sobrevida de ratones BALB/c inoculados con linfoma murino L5178Y y tratados con los extractos etanólico y acuoso de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton & Rose (cactus estrella). Avances en la Investigación en el CUCBA.
- Preza, A. M., Jaramillo, M. E., Puebla-Pérez, A. M., Mateos, J. C., Hernández, R., and Lugo, E. (2010). Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds in relation with in vitro antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10:61
- Pryme, I. F., Bardocz, S. and Putsztai, A. (1994). A diet containing the lectin phytohaemagglutinin (PHA) slows down the proliferation of Krebs II cell tumours in mice. *Cancer Lett*. 76:133-137.
- Pryme, I. F. and Bardocz, S. (2001). Anti-cancer therapy: diversion of polyamines in the gut. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol*. 13:1041-1046.
- Puebla-Pérez, A. M., Huacuja-Ruiz, L., Rodríguez-Orozco, G., Villaseñor-García, M. M., Miranda-Beltrán, M. de la L., Celis, A. and Sandoval-Ramírez, L. (1998). Citotoxic and antitumour activity from *Bursera fagaroides* ethanol extract in mice with L5178Y lymphoma. *Phytotherapy Res*. 12:545-548.
- Reynoso-Orozco, R., Santerre, A., Delgado-Saucedo, J. I., Casas-Solís, J., Velázquez-Magaña, S. and Puebla-Pérez, A. M. (2008). Polyamines as biomarkers of the antitumoral activity of *Bursera fagaroides*. *Interciencia*. 33(5): 384-388.
- Reynoso-Orozco, R. (2004). Las Poliaminas como Bioindicadores del Desarrollo Neoplásico en el Modelo de Linfoma Murino L5178Y y su Aplicación en el Tratamiento del Cáncer. Tesis de grado, Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad de Guadalajara.
- Rosenblum, M. G., Durie, B. G. M., Salmon, S. E. and Russel, D. H. (1978). Metabolism of ¹⁴C spermidine and ¹⁴C putrescine in normal volunteers and in cancer patients. *Cancer Res*.38:3161-3163.
- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torrella, F., Plaza, J., Ramis, G. and Zamora, S. (2011). Effects of fructooligosaccharides on cecum polyamine concentration and gut maturation in early-weaned piglets. *J Clin Biochem Nutr*. 48(3):230-6.
- Sandoval-Salazar, C. (2004). Las poliaminas como biomarcadores del crecimiento neoplásico en el modelo de linfoma L5178Y en ratones BALB/c. Tesis de grado, Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara.
- Uemura, T. and Gerner, E. W. (2011). Polyamine transport systems in mammalian cells and tissues. *Methods Mol Biol*. 720:339-48. doi: 10.1007/978-1-61779-034-8_21.
- Urdiales, J. L., Medina, M. A. and Sánchez-Jiménez, F. (2001). Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroentrol Hepatol*. 13(9):1015-1019.
- Villanueva, V. and Adlakha, R. (1978). Automated analysis of common basic aminoacid, mono-di- and polyamines, phenolic amines, and indole amines in crude biological samples. *Anal Biochem*. 91: 264-275.
- Villanueva, V. R., Mardon, M. and Le Goff, M. (1986). A new high performance chromatographic method for polyamine analysis in *Picea leedles*, without previous extract purification. *Inter. J. Environ, Anal. Cheme*. 25: 115-125.

Villanueva, V. R., Mardon, M., Le Goff, Th. F. and Moncelon, F. (1987). Development of a multi-component analysis system: Application and preliminary results of a comparative study of cellular metabolism in healthy and damaged *Picea* trees from polluted areas. *J of Chromatography A*. 393(1):97-105.