



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE CIENCIAS

### CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD CONTRA EL CÁNCER EN CULTIVOS *in vitro* DE *Tanacetum parthenium*

#### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**VICTOR MENDOZA GONZÁLEZ**

DIRECTOR

**DRA. MARÍA ELENA ESTRADA ZÚÑIGA**

ASESOR EXTERNO

**DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE**



MARZO DE 2015



**DR. JOSÉ GUADALUPE ANAYA ORTEGA**  
**SUBDIRECTOR ACADÉMICO**  
**P R E S E N T E**

Nos permitimos informarle que hemos revisado el trabajo de tesis titulado: **“CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD CONTRA EL CÁNCER EN CULTIVOS *in vitro* DE *Tanacetum parthenium*”**, que presenta el Pas. de Biól. Víctor Mendoza González. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**ATENTAMENTE:**

**DR. CÉSAR VENCES CONTRERAS**

**DR. EDGAR VILLAGRÁN VARGAS**

**DRA. MARÍA ELENA ESTRADA ZUÑIGA**

**DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE**

## DEDICATORIAS

A Eligio Mendoza Martínez, por ser mi padre y formas parte de mi vida y todo lo que he hecho fue gracias a tu apoyo incondicional y al mostrándome tu amor.

A Victoria González Martínez por ser mi madre, y porque me mostraste todo tu amor al darme la oportunidad de vivir, y no escatimaste en ningún momento tu esfuerzo en tu apoyo en cualquier momento.

A Eligio, Maribel, Sarahi y Rosy G., por ser mis hermanos y quienes me apoyaron en todos los aspectos a cada momento y en cualquier actividad, y más aún porque lo siguen haciendo,

A mis cuñados y sobrinos, por formar parte de mí vida, en alegría y compartirme su confianza.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Facultad de Ciencias, que por medio de los doctores quienes fungieron como maestros y maestras, contribuyeron en mi formación académica.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por el apoyo económico otorgado por el proyecto del cual se derivó este trabajo.

A la Dra. María Elena Estrada Zúñiga, por compartirme su conocimiento, ser paciente y guiarme, y principalmente en corregirme. Gracias por permitirme ser parte de este proyecto y ayudarme a concluirlo.

A mis sinodales y revisores D. Cesar Vences, Dr. Edgar Villagrán y Dr. Juan Orozco, por el consejo y observación puntual del trabajo.

Al equipo de Biotecnología Vegetal de la UAMI, Dr. Francisco C.S., Aurelio N., Hipatia. Fueron de gran importancia en el trabajo, por todo el apoyo en infraestructura, la ayuda en el experimento, sus consejos y todo su apoyo.

A mis amigos, Rodolfo G., Emilio, Ara, Norma S., Pamela, V. Soto, Sebastián, Ángela, Magali,... por su valiosa amistad y todo el apoyo que me dieron durante el tiempo que los conocí, y a todos aquellos que se escapan de mi mente y que fueron parte muy importante en mi formación personal y profesional. Los quiero mucho.

A mi creador, por permitirme avanzar en un paso de mi vida y regalarme algo tan maravilloso, como tener una maravillosa familia, y haber conocido a todo un mundo de personas tan extraordinarias como mi asesora, mis amigos, y todas aquellos personitas que me brindan su amor y amistad.

GRACIAS!

## ÍNDICE

I.	ÍNDICE	I
II.	RESUMEN	1
III.	INTRODUCCIÓN	3
IV.	ANTECEDENTES	5
1.	Cáncer y estadísticas	5
1.1.	Estadísticas mundiales	5
1.2.	Estadística en México	6
2.	Definición, tipos y causas	8
2.1.	Ciclo celular y cáncer	9
2.2.	Apoptosis	11
2.3.	Metástasis	11
2.4.	Radicales libres y estrés oxidativo	12
3.	Tratamientos convencionales contra el cáncer	13
3.1.	Cirugía y Quimioterapia	13
3.1.1.	Desventajas de la quimioterapia	14
3.2.	Radioterapia	15
4.	Tratamientos alternativos contra el cáncer	16
4.1.	La terapia Biológica.	16
4.2.	Desarrollo de los nuevos tratamientos	16
4.3.	Compuestos bioactivos obtenidos de plantas	17
4.3.1.	Metabolitos secundarios de plantas	18
4.3.1.1.	Lactonas sesquiterpénicas	18
4.3.1.1.1.	Partenolida	19
4.3.1.2.	Compuestos fenólicos y actividad antioxidante	22
5.	Cultivo de tejidos vegetales	23
5.1.	Factores que determinan el establecimiento de cultivos de tejidos vegetales	25
5.1.1.	Medio de cultivo	25
5.1.2.	Explantes	27
5.1.3.	Otros factores	28
6.	<i>Tanacetum parthenium</i>	28
6.1.	Descripción	28
6.2.	Usos	30
6.3.	Metabolitos secundarios producidos en <i>T. parthenium</i>	31
6.4.	Cultivo <i>in vitro</i> y producción de partenolida	32

<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	34
<b>VI.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	35
<b>VII.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	35
	1. Material biológico	35
	2. Medio de cultivo y condiciones de incubación	36
	3. Cultivos asépticos	36
	4. Multiplicación de brotes	37
	5. Extracción y análisis cuantitativo de metabolitos secundarios	37
	6. Análisis estadístico	39
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	39
	1. Establecimiento de cultivos asépticos	39
	2. Inducción de brotes, hojas y crecimiento en plántulas <i>in vitro</i> de <i>T. parthenium</i>	42
	3. Producción de metabolitos secundarios en órganos de plántulas de <i>T. parthenium</i> cultivadas <i>in vitro</i> con RCV	49
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	54
<b>X.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	56
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS</b>	67
	Anexo 1. Medio de cultivo	67
	1. Soluciones Stock del medio MS	62
	2. Medio basal	68
	Anexo 2. Curvas patrón	68
	Anexo 3. Cromatogramas	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de control (Checkpoints) intrínsecos asociados a la integridad del ciclo celular (Tomado de Alberts y col., 2010)	10
Figura 2. Estructura química de Partenolida (Tomado de Ghantous y col., 2013)	19
Figura 3. Mecanismo de inducción de la apoptosis mediado por partenolida producida por <i>Tanacetum parthenium</i> . (Tomado de Pająk y col., 2008)	22
Figura 4. Planta de <i>Tanacetum parthenium</i>	30
Figura 5. Características fenotípicas de explantes nodales de <i>Tanacetum parthenium</i> observadas después de tratamiento para establecer cultivos asépticos	42
Figura 6. Plántulas <i>in vitro</i> de <i>Tanacetum parthenium</i> cultivadas durante 30 días. (a) Plántula libre de RCV, (b) plántula en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente)	44
Figura 7. Número de brotes inducidos en plántulas de <i>Tanacetum parthenium</i> cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (■) Cultivo en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente). Los datos presentados representan la media $\pm$ desviación estándar	45
Figura 8. Número de hojas formadas en brotes inducidos en las plántulas de <i>Tanacetum parthenium</i> cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (■) cultivo	46
Figura 9. Longitud de hojas formadas en brotes inducidos en las plántulas de <i>Tanacetum parthenium</i> cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (■) cultivo en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente). Los datos presentados representan la media $\pm$ desviación estándar	46
Figura 10. Longitud del tallo desarrollado en plántulas de <i>Tanacetum parthenium</i> cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (■) cultivo en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente). Los datos presentados representan la media $\pm$ desviación estándar	47
Figura 11. Biomasa en peso seco de los órganos desarrolladas de <i>novo</i> en plántulas de <i>Tanacetum parthenium</i> tratadas con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente) cultivadas durante 30 días. (■) Hoja, (■) Tallo y (■) Raíz. Los datos presentados representan la media $\pm$ desviación estándar	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos sobre cáncer en México reportados para el año 2012 (IARC, 2014)	7
Tabla 2. Casos de mortalidad por cáncer en México en el año 2012 (IARC, 2014)	7
Tabla 3. Metodología empleada para la cuantificación de metabolitos secundarios en gradiente para HPLC	38
Tabla 4. Contenido de principales metabolitos secundarios producidos en órganos de plántulas de <i>T. parthenium</i> tratadas con RCV durante 30 días de cultivo	52

## ABREVIATURAS

AC	Ácido Clorogénico
ACaf	Ácido cafeico
ANA	$\alpha$ -naftalenacético
AS	Ácido salicílico
B	Boro
Ca	Calcio
Co	Cobalto
Cu	Cobre
DCQA	di-O-cafeoilquinico
Fe	Hierro
GI	Gastrointestinal
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance liquid chromatography)
HSC	células hepáticas estrelladas
I	Yodo
IARC	Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer (por sus siglas en inglés, International Agency for Research on Cancer)
IFN	Interferones
IL	Interleucinas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
K	Potasio
KIN	Cinetina
LAK	células asesinas activadas por linquinas
MAP	Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MCF	Línea celular cáncer de pecho
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
N	Nitrógeno
NK	asesinas naturales (por sus siglas en inglés, Natural Killer)
P	Fosforo
PMNn	Neutrófilos Polimorfonucleares
PT	Partenolida
RCV	Reguladores de Crecimiento Vegetal
ROS	Especies reactivas a Oxígeno( por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species)
S	Azufre
SSPS	Secretaria de Prevención y Promoción de la Salud
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
UV	Ultra Violeta
Zn	Zinc

## I. RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales, conocido también como cultivo *in vitro* proporciona una fuente alternativa para obtener células, tejidos, órganos y plantas completas en grandes cantidades y con las características deseadas, de acuerdo al interés que se persiga para con la especie vegetal. El cultivo *in vitro* proporciona la capacidad de controlar condiciones que pueden intervenir en la producción de los metabolitos secundarios, que se han usado como fuente alternativa de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades. La especie *Tanacetum parthenium* ha sido investigada por la producción de compuestos con actividad contra cáncer y otras enfermedades degenerativas. El cultivo *in vitro* de esta planta se ha logrado obtener, particularmente el cultivo de callo se ha realizado para promover la producción de metabolitos secundarios, donde se han investigado las condiciones de cultivo con el fin de obtener concentraciones significativas de los metabolitos secundarios. Sin embargo, la producción de los metabolitos secundarios que se ha obtenido es muy baja, de ahí la necesidad de continuar investigando para hacer eficiente esta producción. En el presente trabajo se desarrollaron plántulas a partir de explantes nodales, mismas que fueron tratadas con los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) cinetina (KIN) 0.5 mg/L y ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) (0.05mg/L). Las respuestas obtenidas del tratamiento fueron observadas en varios intervalos durante 30 días. Los resultados mostraron que los RCV incrementaron el número de brotes y hojas inducidos, así como la longitud de las plántulas, encontrándose el mayor efecto a partir del día 24 de incubación ( $13 \pm 2.34$  brotes inducidos,  $109 \pm 20.71$  hojas inducidas y una longitud de la plántula de  $7.5 \pm 1.35$  cm) comparado con el control ( $4 \pm 0.76$  brotes,  $60 \pm 10$

hojas y longitud de plántula de  $4\pm 0.72$  cm). Se detectó y cuantificó en las hojas, tallos y raíces de *T. parthenium* de plántulas tratadas con los RCV al ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido salicílico a los días 21, 24, 27 y 30 de incubación. La mayor producción de ácido clorogénico y ácido cafeico ocurrió al día 21 para los tres órganos (2.5, 1.9 y 1.2 mg de ácido clorogénico/g, y 0.78, 0.27 y 0.49 mg de ácido cafeico/g para hojas, tallos y raíces, respectivamente), mientras que para ácido salicílico en hojas se determinó al día 30 (2.9 mg de ácido salicílico/g) y en raíz al día 21 (0.3 mg/g).

## II. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un serio problema de salud pública a nivel mundial debido a que se considera como una de las principales causas de muerte. Datos recientes reportan al cáncer como la tercera causa de muerte en el país (Meneses-García y col., 2012; Ferlay y col., 2010). Esta enfermedad se caracteriza por un crecimiento fuera de control de las células y la invasión a tejidos (metástasis), provocando una pérdida en la organización y función de células, tejidos y órganos. Muchos tipos de cáncer son tratados con métodos convencionales como la cirugía (Pecorino, 2012), radiación y quimioterapia; estos últimos son procesos que pueden ser altamente tóxicos con un margen de eficacia ya que no son selectivos entre células tumorales y normales (Kelley, 2012), además que durante la metástasis las células pueden desarrollar resistencia a estos tratamientos, factores que contribuyen de manera significativa a la letalidad de la enfermedad (Pei y col., 2012; Tibes y col., 2005). Ante los problemas que presentan los tratamientos contra el cáncer, existe la necesidad de desarrollar fármacos naturales. Los productos vegetales son una de las fuentes de interés para el desarrollo de fármacos contra cáncer; debido a que es uno de los principales tópicos en investigación y que están tomando gran importancia la combinación de tratamientos convencionales con compuestos citotóxicos de plantas (Pei y col., 2012; Tibes y col., 2005; Hemalswarya y Doble, 2006; Waterhouse y col., 2006; Gottesman, 2002). Diversos compuestos derivados de plantas, conocidos como metabolitos secundarios, han mostrado efectos significativos en tumorigénesis, células tumorales *in vitro*, tumores en animales experimentales *in vivo*, interacción con drogas anticáncer y protección de tejidos normales contra efectos adversos de terapias anticáncer (Korkina y

Kostyuk, 2012). Entre dichos compuestos se encuentran los terpenoides tipo lactonas, metabolitos secundarios que han mostrado una gran variedad de actividades biológicas incluyendo la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antiúlceras, antiviral y anticáncer (Woods y col., 2013). Otro tipo de metabolitos secundarios producido por plantas que se ha determinado pueden contribuir de manera significativa a la terapia contra el cáncer, son los compuestos fenólicos ya que contribuyen a la actividad antioxidante (Díaz y col., 2012). Diversas investigaciones revelan que el estrés oxidativo es un proceso que se lleva a cabo a nivel celular bajo la ocurrencia de una enfermedad, incluyendo al cáncer, siendo en muchas ocasiones la maquinaria antioxidante intrínseca de las células incapaz de neutralizar dicho estrés; por lo que la adquisición de moléculas poseedoras de actividad antioxidante es deseable (Vermerris y Nicholson, 2006).

El contenido de metabolitos secundarios en plantas puede presentar fluctuaciones pues su síntesis está asociada a procesos fisiológicos y condiciones de estrés biótico y abiótico (Cinege y col., 2009; Tholl y col., 2006; Vermerris y Nicholson, 2006) ya que está regulada espacial y temporalmente, ocurriendo en células, órganos y tejidos específicos (Verpoorte y col., 2002). El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales permite producir metabolitos secundarios bioactivos (Benson, 2000) de manera continua y controlada por lo que esta tecnología puede contribuir de manera significativa al desarrollo de fármacos con aplicaciones en el tratamiento de cáncer. Una especie de interés por la actividad biológica del contenido de productos naturales (metabolitos secundarios) es *T. parthenium* (L.) Sch. Bip. (Rzedowski y col., 2005; USDA, 2014), una especie empleada en la medicina tradicional la cual produce compuestos tipo fenólicos y terpenoides (Wu y

col., 2006) las cuales tienen múltiples propiedades farmacológicas (Pareek y col., 2011). El cultivo *in vitro* de *T. parthenium* puede generar conocimientos significativos sobre la caracterización en términos de crecimiento así como producción de metabolitos secundarios bioactivos.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **1. Cáncer y estadísticas**

##### **1.1. Estadísticas mundiales**

En el 2012, las enfermedades no transmisibles, entre las cuales se encuentra el cáncer, causaron más de 68% de las muertes en el mundo, lo que representa un aumento en comparación con el 60% registrado en el año 2000 (OMS, 2013). El cáncer se considera como una de las principales enfermedades causante de numerosas muertes en todo el mundo (Steward y Kleihues, 2003; OMS, 2013). Aproximadamente 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer anualmente y más de 6 millones mueren cada año; para el año 2012 más de 22 millones de personas fueron pacientes de cáncer (Bray y col., 2012). La aproximación de la población, en todo el mundo, que estará afectada por cáncer para el año 2030 es de 23.6 millones y 13.2 millones de muertes. El cáncer afecta a todas las comunidades, sin embargo la carga mayor en la incidencia está asociada al estilo de vida (Bray y col., 2012) de países económicamente en desarrollo (Karimian y col., 2014) los cuales presentan patrones similares de incidencia de cáncer, tal es el caso de aquellos

países asociados a América del Norte, Europa del Norte, Europa Occidental y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) (Steward y Kleihues, 2003).

Los costos para el tratamiento de cáncer son muy altos en todo el mundo. Un ejemplo claro lo menciona La Sociedad Americana de Cáncer (The American Cancer Society) quienes hacen un reporte para el 2010 del total de costo de medicamento para los Estados Unidos de América de \$102.8 billones, un 9% más que al año anterior. El costo total, incluyendo la pérdida de productividad debido a morbilidad y mortalidad es de 150% más que el costo de tratamientos. Aunque los pacientes puede vivir por mucho tiempo, ya sea curándose o en remisión prolongada, la carga de atención sigue subiendo (Kelley, 2012; Karimian y col., 2014).

## **1.2. Estadísticas en México**

En México, la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) describe al cáncer como la tercera causa de muerte (Meneses-García y col., 2012; Ferlay y col., 2010) y se estima que cada año se detectan 128 mil nuevos casos (Secretaria de Prevención y Promoción de la Salud [SSPS], 2013). En 2012 del total de defunciones, 13% se debieron a algún tumor (SSPS, 2013). Registros de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, (International Agency for Research on Cancer, IARC) hacen una estimación de la población en México de casos de cáncer y cifras de casos que han llevado a la muerte, así como las estimaciones por esta causa (Tabla 1 y Tabla 2). Además, los costos para el tratamiento de cáncer son muy altos, esto debido a la fase en la cual se encuentra el paciente. Por ejemplo, el IMSS reportó un costo estimado de \$110 459 por paciente de cáncer de pecho

en mujeres en un año; solo su detección y tratamiento para 16 346 pacientes representó en 2002 poco más de 1 805.5 millones de pesos (Knaul y col., 2009).

Tabla 1. Casos sobre cáncer en México reportados para el año 2012 (IARC, 2014).

México	Masculino	Femenino	Ambos sexos
Población (miles)	57288	58858	116146
Número de nuevos casos (miles)	65.5	82.4	148.0
Riesgo de adquirir cáncer después de los 75 años (%)	12.8	14.0	13.4
Cinco años de prevalencia, en población adulta (miles)	138.3	220.1	358.4
Cánceres más frecuentes	Próstata Pulmón Colorrectal Estomago Leucemia	Pecho Cérvicouterino Colorrectal Estómago Hígado	Pecho Próstata Cérvicouterino Colorrectal Pulmón

Tabla 2. Casos de mortalidad por cáncer en México en el año 2012 (IARC, 2014)

Hombres		Mujeres	
Tipo de cáncer	Mortalidad (por cada 100,000 habitantes)	Tipo de Cáncer	Mortalidad (por cada 100000 habitantes)
Leucemia	2,280	Cuerpo uterino	550
Riñón	1,304	Leucemias	1,984
cerebro, sistema nervioso	1,258	Ovarios	2,105
Limfoma no Hodgkin	1,380	Colorrectal	2,166
Hígado	2,919	Pulmón	2,663
Estomago	3,368	Estomago	2,913

Colonorectal	2,528	Hígado	3,149
Pulmón	4,945	Cervicouterino	4,769
Próstata	6,367	Pecho	5,680
Otros	12,323	Otros e inespecíficos	14,074

## 2. Definición, tipos y causas

El cáncer se caracteriza por el crecimiento desorganizado y no regularizado de células, así como su invasión y propagación a otra parte del cuerpo (metástasis), resultado de la mutación en los genes asociados con el ciclo celular y la apoptosis. Se cree que el inicio del cáncer es causado frecuentemente por algunas formas de agentes genotóxicos tales como la radiación o un químico carcinógeno aunque las células en este estado alterado a nivel DNA permanecen fenotípicamente normales. Estudios realizados permiten concluir que este proceso es consecuencia de la acumulación de múltiples mutaciones genéticas en el DNA, heredadas y/o adquiridas, en genes que bajo condiciones normales participan en los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular (genes conocidos como PROTO-ONCOGENES, que una vez mutados reciben el nombre de ONCOGENES), así como el control de la integridad del genoma. Por ello se propone que el cáncer es una enfermedad genética, y la acumulación de mutaciones es la razón más importante para su ocurrencia (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000; Macdonald y col., 2004).

Se han definido características de muchos tipos de cáncer como lo menciona Pecorio (2012), pero no de todos, como la adquisición de la capacidad de señalización autónoma de crecimiento, evasión de muerte celular, potencial de replicación ilimitada, angiogénesis

(formación de vasos sanguíneos nuevos) y la invasión a otro tipo de tejidos son esenciales para carcinogénesis. El cáncer se define en función del tejido de origen como: a) Carcinoma, tumores de células epiteliales que recubren órganos, glándulas o estructuras corporales; b) Sarcoma, originado de tejidos conectivos que sostienen al cuerpo; c) Leucemia, no presenta tumoración sino que nace de la médula ósea; d) Linfoma, se refiere a células del sistema linfático (González, 2007).

Entre los factores que juegan un rol importante en el desarrollo de cáncer se encuentran la dieta, exposiciones ocupacionales, infecciones y hábitos sexuales (Pecorino, 2012; Díaz-Rubio y García-Conde, 2000). Agentes exógenos físicos y químicos, naturales o sintéticos, causan muchos tipos de daños al DNA y son factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Kelley, 2012).

## **2.1. Ciclo celular y cáncer**

El ciclo celular involucra una serie de eventos donde el resultado es la duplicación del DNA y la división celular. La replicación celular es su proceso que está altamente regulado, pues esto ayuda a garantizar una exacta y completa transferencia de material genético. Las claves que contribuyen a esta regulación son los puntos control (Checkpoints) (Figura 1). Estos puntos pueden prevenir la progresión del ciclo celular, la segregación del cromosoma dañado, prevenir generación de lesiones secundarias, modificación de la transcripción, potenciar la acción de reparación y modular niveles de reparación de proteínas. Los puntos de control son intrínsecos para la integridad del ciclo celular y respuesta al daño de DNA (Kelley, 2012). En células normales este proceso está

cuidadosamente controlado pero no en tumores celulares. Cambios en el DNA así como en la estructura de los cromosomas son comunes en la mayoría de los cánceres. La evidencia sugiere que en la mayoría de los casos, los cánceres surgen de una sola célula que ha adquirido algunas formas heredables de ventaja de crecimiento (Macdonald y col., 2004). Un tumor benigno no es evidencia de cáncer, no se propaga por el cuerpo, en cambio un tumor maligno si lo hace, invade y realiza metástasis (Pecorino, 2012).

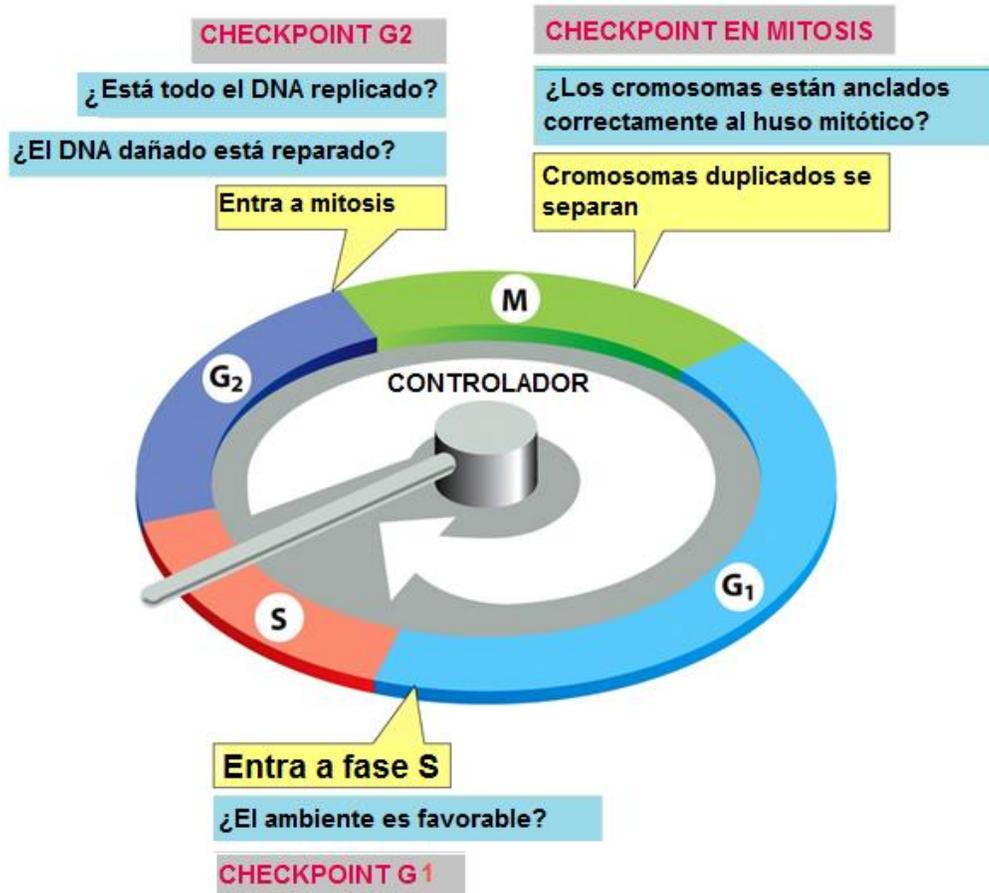


Figura 1. Puntos control (Checkpoints) intrínsecos asociados a la integridad del ciclo celular (Tomado de Alberts y col., 2010).

## **2.2. Apoptosis**

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso activo de muerte natural programada de células para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de tejidos (Wyrebska y col., 2013; Díaz-Rubio y García-Conde, 2000; Lanore y Delprat, 2004) por una serie de eventos genéticamente controlados que da como resultado la eliminación de células no deseadas. La supresión de la apoptosis conduce a crecimientos anormales. Presenta características, como el encogimiento celular, condensación nuclear, fragmentación cromosoma de DNA, formación de cuerpos apoptóticos y pérdida de la organización posicional de orgánulos en el citoplasma (Wyrebska y col., 2013). La apoptosis juega un importante rol en la generación de tumores (tumorigénesis). Una de sus funciones es eliminar las células en las que se ha producido daño en el DNA que no ha sido reparado. Sin embargo, en el cáncer la apoptosis generalmente se encuentra alterada, promoviendo la tumorigénesis (Macdonald y col., 2004)

## **2.3. Metástasis**

Una característica que poseen las células cancerígenas es la capacidad de invadir a otros tejidos, a éste proceso se le denomina metástasis (Pecorino, 2012). La metástasis es un proceso de múltiples pasos que incluye proliferación celular, degradación proteolítica de la matriz extracelular, migración celular a través de la membrana basal para encontrar el sistema circulatorio, y la remigración y crecimiento de tumores a nuevos y diversos tipos de tejidos (Cheng y Xie, 2011).

## 2.4. Radicales libres y estrés oxidativo

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón no apareado por lo cual se les considera como fragmentos de moléculas que son en general muy reactivos. Ellos se producen continuamente cuando las células usan oxígeno para generar energía; los radicales libres son creados principalmente como consecuencia de la producción del ATP por la mitocondria ya sea como subproductos del metabolismo o por algún proceso, por ejemplo la fagocitosis (Cheeseman y Slater, 1993). Estos productos son generalmente especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS por sus siglas en inglés) que son resultados de procesos celulares redox (Pham-Huy y col., 2008). Otras fuentes de radicales libres a nivel celular son: los peroxisomas, los neutrófilos polimorfonucleares (PMNn) activados, la enzima xantina oxidasa. Las ROS son importantes en la regulación de las señales de transducción, expresión de genes y activación de receptores (Díaz y col., 2012). Sin embargo, cuando hay producción en exceso, los radicales libres al ser oxidantes generan un fenómeno llamado estrés oxidativo (Wang y col., 2014). Un exceso de radicales libres es tóxico para casi todas las moléculas biológicas en la célula viva y puede causar daño oxidativo para macromoléculas funcionales tales como el DNA, proteínas y lípidos de la membrana si no son eliminados rápidamente, daños que pueden ser irreversibles (Díaz y col., 2012). Las modificaciones sobre el aparato genético propician mutaciones a los genes, conllevando la pérdida de la expresión o la síntesis incorrecta de proteínas (González, y col., 2001). Se ha relacionado al estrés oxidativo con el desarrollo de padecimientos crónicos degenerativos tales como el cáncer, artritis, diabetes, envejecimiento, arterosclerosis, desordenes autoinmunes, cardiovasculares, inflamatorias

y enfermedades neurodegenerativas (Wang y col., 2014; Pham-Huy y col., 2008; Dakah y col., 2014).

### **3. Tratamientos convencionales contra cáncer**

#### **3.1. Cirugía y quimioterapia**

Los métodos convencionales empleados para curar el cáncer pueden comprender el método de cirugía que es empleado para remover el tumor y parte del tejido que lo rodea. En algunos casos solamente se puede extirpar la mayor parte de un sarcoma con el objetivo de disminuir la masa tumoral como primera estrategia de curación aplicándose a tipos de cánceres relativamente fáciles, pero imposibles en otros, debido a que este procedimiento no es a nivel celular (Pecorino, 2012), por tal motivo se han empleado técnicas como la quimioterapia para el tratamiento de muchos padecimientos de este tipo como complemento de la cirugía (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000).

La quimioterapia puede definirse como el tratamiento del cáncer con compuestos “químicos” con propiedades antitumorales administrados por vía oral, intravenosa, inyectados en una cavidad corporal, en un músculo, o en el líquido espinal. Los mecanismos de acción de los fármacos quimioterapéuticos son muy variados, según su modo de acción y su objetivo a nivel celular (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000). Los agentes pueden clasificarse de dos maneras por sus efectos en el ciclo celular y por su mecanismo bioquímico de acción. Algunos fármacos pueden afectar fases específicas del ciclo celular (específico de fase), mientras que otros actúan sin tener en cuenta el ciclo

celular (inespecíficos de fase) (Rodak, 2004). La quimioterapia es la principal forma de tratamiento de la enfermedad maligna diseminada y tiene un papel muy importante en determinados tumores clínicamente localizados (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000; Rodack, 2004). El objetivo de las quimioterapias es prevenir la proliferación celular (efectos citostáticos) y matar células cancerígenas (efectos citotóxicos). El modo de acción de muchos agentes anti-cáncer es causar daño al DNA (Kelley, 2012). La quimioterapia citotóxica, su finalidad es causar daño severo al DNA para así activar la apoptosis de células cancerígenas que presentan rápida división (Pecorino, 2012). La quimioterapia continúa siendo el tratamiento de elección para cáncer en estado de metastasis avanzada (Cheng y Xie, 2011).

### **3.1.1. Desventajas de la quimioterapia**

Los efectos secundarios de las quimioterapias son muy severos debido a que los agentes quimioterapéuticos son inespecíficos, esto es, afectan tanto a las células normales como a las neoplásicas. El efecto es más pronunciado en las células con división rápida como las de la mucosa del tracto gastrointestinal (GI) y de la médula ósea. Esto limita el rango terapéutico y por lo general determina la dosis máxima tolerada por un paciente (Rodak, 2004; Pecorio, 2012). Las náuseas y vómito inducidos por la quimioterapia son síntomas muy frecuentes, aunque habitualmente autolimitados, suponiendo un problema importante en el deterioro de la calidad de vida y la dificultad de cumplimiento del plan terapéutico preestablecido (Mendoza, 2008). Otros efectos secundarios son la alopecia, úlceras, anemia (Pecorino, 2012).

La quimioterapia presenta problemas graves contra el cáncer, el efecto de las dosis y la quimioresistencia. Se estudian varios genes resistentes a drogas, los cuales permiten a las células cancerosas protegerse contra varios agentes quimioterapéuticos (Kelley, 2012). Así, en general, la eficacia de la quimioterapia es frecuentemente obstaculizada por la resistencia a fármacos (Cheng y Xie, 2011). Los científicos intentan encontrar un fármaco para aplicación de quimioterapia específica que pueda erradicar un tipo particular de cáncer (Kelley, 2012).

### **3.2. Radioterapia**

La radiación, especialmente los rayos X, se utiliza con mayor frecuencia para tratamiento de cáncer en procesos malignos, para matar las células mediante producción de iones inestables que dañan el DNA y en consecuencia puede causar la destrucción instantánea o diferida. La terapia de radiación es frecuentemente usada para el tratar estados tempranos y regiones inoperables de cáncer (Sun y col., 2007). El sistema hematopoyético, el tracto gastro-intestinal y la piel son afectados con mayor frecuencia durante la radioterapia. Los efectos tóxicos por lo general son reversibles cuando se suspende la radiación, y pueden aparecer durante el tratamiento o mucho después (Rodak, 2004; Díaz-Rubio y García-Conde, 2000).

Asimismo, puede tratarse al cáncer en un esquema de tratamiento adyuvante con el objetivo hacer eficiente el procedimiento, así como erradicar posibles micrometástasis que no pueden controlarse y que posteriormente pueden convertirse en metástasis. Dicho tratamiento consiste en la combinación entre los tratamientos convencionales

(quimioterapia, radiación o cirugía) (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000). Las combinaciones de tratamientos han sido y se están probando en intentos para superar la resistencia a tratamientos convencionales (Kelley, 2012).

## **4. Tratamientos alternativos contra el cáncer**

### **4.1. La terapia biológica**

La terapia biológica es un tratamiento contra el cáncer con compuestos conocidos como “antitumorales” cuyo efecto debe lograr modificar los mecanismos de defensa del huésped para su estimulación y, en menor proporción causar citotoxicidad directa. Para ello, se emplean los Interferones (IFN), reguladores de diferenciación y aumentan la expresión de una amplia variedad de antígenos de superficie. Las Interleucinas 2 (IL-2) tienen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune, estimula la actividad y proliferación de linfocitos T, B y Macrófagos, células asesinas naturales (NK) y de células asesinas activadas por linquinas (células LAK) que poseen actividad tumoral, liberación de  $\gamma$ -IFN que es inhibidor de angiogénesis, activa macrófagos, estimula las NK e induce la producción de anticuerpos por los linfocitos B (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000).

### **4.2 Desarrollo de nuevos tratamientos**

El desarrollo de nuevos tratamientos en humanos puede progresar con ensayos clínicos. La mayoría de fallas en las terapias convencionales es la falta de selectividad de células tumorales contra células normales. En consecuencia, el tratamiento que se busca es el

cómo matar las células cancerígenas sin causar daño a células normales (Kelley, 2012). Existe la necesidad de aprender acerca de las diferencias entre células normales y transformadas a nivel molecular para la identificación de objetivos moleculares específicos de cáncer (Pecorino, 2012). Indirectamente, se determinó empíricamente que el cáncer es más heterogéneo, y los genes gobiernan una gran cantidad de funciones que contribuyen colectivamente a la transformación carcinogénica, además de que las células cancerígenas incorporan numerosos mecanismos de reparación de daños del DNA que impiden la eficacia a la quimioterapia (Kelley, 2012). Investigaciones recientes pretenden hallar un gen individual que pueda corresponder a un tipo particular de cáncer, con el objetivo de silenciar la función del gen tumorigeno o restaurar la pérdida de la funcionalidad genética (Kelley, 2012). Existe la necesidad de identificar nuevos agentes activos, particularmente para el tratamiento de pacientes que no responden adecuadamente a tratamientos convencionales (Cheng y Xie, 2011). La situación acerca del costo de la terapia para el cáncer por químicos y fármacos sintéticos es muy alta y permanece sin hallarse un fármaco para el tratamiento eficaz de muchos tipos de cánceres (Karimian y col., 2014).

### **4.3. Compuestos bioactivos obtenidos de plantas**

La necesidad para el desarrollo de fármacos naturales ha ido en aumento. Los efectos de frutas y vegetales en la prevención y reducción en riesgo de cáncer son muy conocidos por lo que las plantas representan una de las fuentes cruciales de fármacos contra cáncer. La contribución de productos naturales para terapias contra cáncer es más evidente

considerando que estos han sido involucrados en el desarrollo de aproximadamente el 75% de agentes anticáncer entre 1981 y 2010. De éste modo, el aislamiento y caracterización de productos naturales con actividad anticáncer es un aspecto importante a considerar en la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial contra el cáncer (Karimian y col., 2014).

#### **4.3.1. Metabolitos secundarios de plantas**

Un gran número de compuestos bioactivos obtenidos de plantas se han identificado como metabolitos secundarios, es decir aquellos compuestos bioactivos complejos de bajo peso molecular, que juegan roles en la interacción de la planta con el ambiente. La producción de estos compuestos es frecuentemente baja y depende del estado fisiológico y de desarrollo de la planta. Acorde a la ruta de biosíntesis se pueden identificar los tipos: fenilpropanoides (también conocidos como compuestos fenólicos), alcaloides y terpenoides. Se ha determinado que un grupo importante de potencial actividad contra el cáncer son los terpenoides, particularmente las lactonas sesquiterpénicas, así como los fenilpropanoides, también conocidos como compuestos fenólicos (Oksman-Caldentey e Inze, 2004).

##### **4.3.1.1. Lactonas sesquiterpénicas**

Se ha observado que algunos compuestos derivados de plantas pueden sensibilizar a las células cancerígenas a la apoptosis. Tal es el caso de las lactonas sesquiterpénicas, las cuales constituyen un grupo de metabolitos secundarios tipo terpenoides C15

consistiendo de tres unidades isopreno con un anillo lactónico, que presentan los componentes activos de muchas plantas medicinales de la familia Asteraceae. Estos compuestos se obtienen a partir de hojas y flores de las plantas (Dupuy y col., 2008; Bone y Mills, 2013). Se ha determinado que estos tipos de compuestos presentan una actividad biológica significativa capaz de contrarrestar el cáncer.

#### 4.3.1.1.1. Partenolida

La Partenolida (PT) es un sesquiterpeno tipo lactona, es el mayor constituyente de matricaria, *Tanacetum parthenium* (L.), y varios miembros de la familia Asteraceae y Magnoliaceae (Fischer y col., 1991). La partenolida (PT) (Figura 2) contiene un anillo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona y un epóxido, donde interactúa fácilmente con sitios nucleofílicos en moléculas biológicas (Hee y col., 2012). La PT ayuda a prevenir un excesivo aglutinamiento de plaquetas (Castañeda-Acosta y col., 1995). Permite la inhibición de liberación de ciertas sustancias químicas, incluyendo la serotonina y algunos mediadores inflamatorios (Makheja y Baley, 1982).

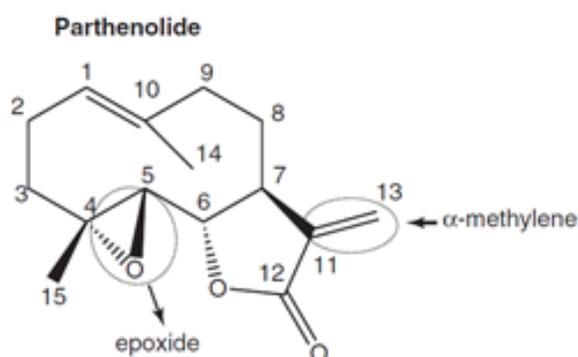


Figura 2. Estructura química de Partenolida (Tomado de Ghantous y col., 2013).

La PT ha sido reportada como compuesto poseedor de propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y anticáncer, este último asociado a la inducción de apoptosis (Figura 3) (Czyz y col., 2010; Cheng y Xie, 2011; Hee y col., 2012). La actividad biológica contra el cáncer se probó en líneas celulares cancerígenas de pecho y en líneas celulares humanas de osteosarcoma y melanoma, encontrándose que la PT provocó citotoxicidad induciendo la muerte celular (apoptosis) (D'Anneo y col., 2013; Wyrebska y Szymanski, 2013); inhibió la habilidad de las células madre de leucemia a responder al estrés oxidativo e hizo a las células susceptibles a la muerte mientras que células madre normales permanecieron relativamente sin daños ante la PT (Pei y col., 2012); inhibió selectivamente, a través de modulación epigenética, el crecimiento de queratinocitos neoplásicos con escaso efecto sobre aquellas del tipo normal (Ghantous y col., 2012); mostró un efecto radiosensibilizador en células de cáncer de próstata (Sun y col., 2007); mostró efectos significativos sobre la activación de genes implicados en la respuesta antioxidante (Fischedick y col., 2012); mostró efecto protector contra cáncer de piel inducido por luz UV (Yen-Kim y col., 2004). También, ha tenido efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos (Karimian y col., 2014; Hee y col., 2012) contra una variedad de tumores en estudios *in vitro* y en modelos animales. Hee y col. (2012) demostraron el efecto apoptótico de PT en células RI-T y células hepáticas estrelladas (HSC) de rata. En células cancerígenas humanas la PT activó una serie de respuestas que incluyeron la aparición de estrés oxidativo, agotamiento de tiol intracelular, estrés en el retículo endoplasmático, activación de caspasa y disfunción mitocondrial (Zhang y col., 2004). PT Inhibe el factor nuclear kappa (NF- $\kappa$ ) el cual regula la transcripción antiapoptótica, lo que conlleva a la estimulación de

las vías apoptóticas intrínsecas quienes involucran elevados niveles de especies reactivas a oxígeno intracelulares (ROS) y modificaciones de proteínas de la familia Bcl-2. Asimismo, se ha demostrado que la PT inhibe la incorporación de timidina dentro del DNA y entonces la actividad antitumoral puede ocurrir en el nivel de replicación del DNA (Knight, 1995). Inhibe la unión de factores de transcripción como STAT-3 (el transductor de señal y activador de la transcripción) al DNA, reduce la actividad de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasa) y promueve la generación de oxígeno reactivo (Cheng y Xie, 2011). Se sugiere que el incremento en el estrés oxidativo está involucrado en la apoptosis inducida por PT en HSCs (Hee y col., 2012).

La PT fue uno de los primeros compuestos que mostraron toxicidad contra cáncer de células madre solo o en combinación con vinorelbina (Czyz y col., 2010). La PT ha sido combinada con trióxido arsénico o lactasina en células leucémicas, y con sulindaco en carcinoma pancreática, donde se ha demostrado que promueve la supresión del crecimiento y apoptosis y reduce metástasis en combinación con docetaxel (Czyz y col., 2010).

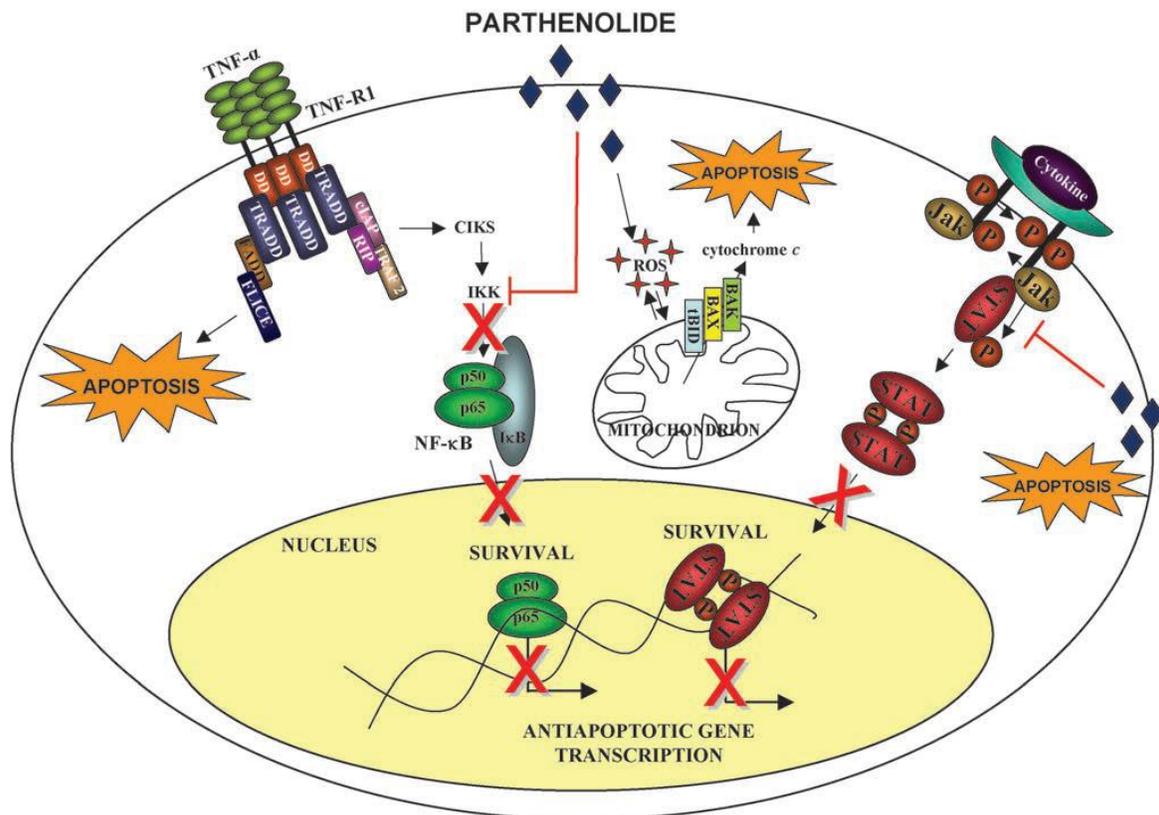


Figura 3. Mecanismo de inducción de la apoptosis mediado por partenolida producida por *Tanacetum parthenium*. (Tomado de Pajak y col., 2008).

#### 4.3.1.2. Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

La dieta de fenólicos ha captado una atención en incremento en los recientes años debido a sus conocidas propiedades antioxidantes. En general, los fenilpropanoides (mejor conocidos como compuestos fenólicos) contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo lo que les confiere excelentes propiedades de quelación de metales y metales de transición, así como una gran capacidad antioxidante. La actividad antioxidante se refiere a la capacidad de captar radicales libres (hidroxilo y superóxido), vía inactivación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres (Wu y col., 2006; Hee y col., 2012). Los fenólicos de las plantas contribuyen a la actividad antioxidante

(Díaz y col., 2012), promoviendo efectos benéficos a la salud. El consumo de cantidad suficiente de antioxidantes ha sido recomendada para prevenir o disminuir el estrés oxidativo inducido por radicales libres (Wang y col., 2014). Los fenólicos actúan como antioxidantes exógenos que son eliminadores de radicales libres, útiles para prevenir y reparar los daños causados por ROS, además pueden aumentar las defensas del sistema inmune y disminuir el riesgo de cáncer y enfermedades degenerativas (Pham-Huy y col., 2008). Compuestos antioxidantes de plantas pueden minimizar la generación de radicales libres y aliviar enfermedades causadas por estrés oxidativo, entre las cuales se encuentra el cáncer. Hierbas selectas pueden ser una fuente rica en antioxidantes y compuestos depuradores de radicales libres. Los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides han sido correlacionados con actividades antioxidantes y antiinflamatorias de extractos herbáceos de especies de uso medicinal (Díaz y col., 2012).

## **5. Cultivo de tejidos vegetales (CTV)**

Las plantas medicinales juegan un importante rol en el tratamiento de enfermedades, pues representan un suplemento de materia vegetal que contiene metabolitos secundarios bioactivos. Sin embargo, debido a su inherente función en la planta, la calidad del material vegetal, asociada al contenido de compuestos bioactivos puede ser fluctuante. Por lo tanto, los laboratorios de todo el mundo están intentando producir metabolitos secundarios por cultivo de tejidos de plantas como una alternativa a las aplicaciones comerciales (Dakah y col., 2014).

El cultivo de tejidos es ahora una tecnología bien establecida. Inicialmente, el cultivo de tejidos vegetales fue explotado como una herramienta de investigación y enfocado en intentos para cultivar y estudiar el desarrollo de pequeños, segmentos aislados de tejidos de plantas o células aisladas. Muchos laboratorios comerciales fueron establecidos alrededor del mundo para capitalizar en el potencial de micropropagación para la producción en masa de plantas clonales para la industria de la horticultura. Hoy en día la aplicación de cultivo de tejidos vegetales abarca mucho más que propagaciones clonales y micropropagación, abarcando la embriogénesis somática, hibridación somática, eliminación de virus, uso de bioreactores para la propagación en masa, y cultivos de células y órganos para la producción de metabolitos secundarios (Akin-Idowu y col., 2009).

El cultivo de tejidos vegetales, también llamado cultivo *in vitro*, es una práctica usada para propagar células, tejidos, órganos o plantas bajo condiciones estériles o en ambientes controlados (Dieter, 1991). En este proceso, las condiciones de crecimiento incluyen la temperatura, luz, medio de cultivo adicionado de nutrientes, reguladores de crecimiento vegetal, entre otros. El CTV cuenta con un factor que muchas células de plantas tienen y es la habilidad de generar nuevas células hasta plantas completas (totipotencia) (Dieter, 1991). Simples células, células de plantas sin pared celular (protoplasto), piezas de hojas, o raíces pueden frecuentemente ser usados para iniciar cultivos *in vitro* empleando medios de cultivo que aportan los requerimientos necesarios de nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal (también conocidos como hormonas de crecimiento vegetales o fitohormonas) (Vidyasagar, 2006). El cultivo de tejidos de plantas superiores en medios estériles provee métodos para el estudio de vías biosintéticas y el control de mecanismos

sin complicaciones presentadas en plantas intactas, o bien para el desarrollo de cultivos encaminados a la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico y otros tipos de compuestos químicos (Dieter, 1991).

## **5.1. Factores que determinan el establecimiento de cultivo de tejidos vegetales**

### **5.1.1 Medio de cultivo**

Los medios de cultivo son generalmente compuestos de sales inorgánicas adicionadas con un poco de nutrientes orgánicos, vitaminas y hormonas de plantas. El éxito de cultivo de tejidos involucra la optimización de los componentes claves del medio: a) compuestos inorgánicos: macronutrientes (Ca, K, Mg, N, P, S); micronutrientes (B, Co, Cu, Fe, I, Mo, Mn, Zn); b) compuestos orgánicos: vitaminas como tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6), ácido nicotínico (vitamina B3), mioinositol, aminoácidos (glicina y prolina), fuente de carbono (sacarosa, glucosa y fructosa), reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas (auxinas, citocininas, ácido giberélico, ácido abscísico), agente gelificante (agar, agarosa, gelrite, phytigel, alginato). Otros factores aditivos son el carbón activado, poliaminas, antioxidantes, jasmonatos, salicilatos, oligosacáridos. La composición del medio, particularmente de reguladores de crecimiento vegetal y fuentes de nitrógeno tiene profundo efecto en la morfología del tejido que crece del explante inicial. El exceso de auxina puede resultar en la proliferación de raíces, mientras que el exceso de citocininas puede producir brotes (Akin-Idowu y col., 2009). Un balance de auxinas y citocininas frecuentemente producen un crecimiento desorganizado de células, o callo, pero la

morfología del crecimiento externo puede depender de especies y fuente de explantes de la planta también como de la composición del medio.

La sacarosa es usualmente adicionada al medio de cultivo como una fuente de carbono que propicia el crecimiento de manera heterotrófica. Sin embargo, para algunas especies, glucosa es el sustrato preferido. La optimización de sacarosa, junto con otros macronutrientes clave tales como el nitrógeno pueden tener un profundo efecto en la capacidad de diferenciar células para la proliferación *in vitro*. Niveles superiores al óptimo de sacarosa también tienen efecto negativo asociado con la hiperhidricidad. El re-emplazo de sacarosa por glucosa como una fuente de carbono aumenta el crecimiento de algunas especies (Banthorpe y col., 1986).

La adición de antioxidantes puede ser implementada (Benson, 2000) cuando se observan un rápido pardecimiento o ennegrecimiento de los tejidos que puede dar lugar a necrosis de los tejidos y en los casos más extremos, la muerte del explante. La oxidación de explantes en cultivos iniciales es una causa frecuente de recalcitrancia temprana *in vitro* en tejidos que tienen un contenido alto en fenólicos. Además, el cultivo de tejidos involucra estrés por los cortes, causando cambios fisiológicos en la planta (León y col., 2001) que pueden afectar el éxito del establecimiento de cultivos *in vitro*. También, es probable que los componentes específicos de los medios de cultivo (iones metales) puedan aumentar la oxidación de fenoles.

Muchos estudios han aplicado el uso de elección de condiciones de cultivo para maximizar el crecimiento; pero estos pueden no ser buenas elecciones para favorecer la producción

de metabolitos secundarios. Éste último puede ser estimulado cuando la división celular es lenta o ha cesado, y metabolitos y cofactores estén disponibles para procesos alternativos para metabolismo primario (Banthorpe y col., 1986).

### **5.1.2. Explantes**

El tejido obtenido de una planta para cultivo es llamado explante. Varios factores relacionados con el explante influyen en el establecimiento de cultivos *in vitro* (Benson, 2000). El factor significativo en el cultivo incluye diferencias en el estado de las células en el ciclo celular, la disponibilidad o la capacidad para transportar reguladores de crecimiento endógenos y capacidades metabólicas de las células. Los explantes más comunes son los meristemos, la punta del tallo, los brotes axilares y las puntas de las raíces; estos tejidos tienen altas tasas de división celular, además tendrán mejor respuesta a los reguladores de crecimiento vegetal para producir el tipo de cultivo a obtener así como su crecimiento ya que éstos tienen la capacidad de producir sustancias reguladores de crecimiento incluyendo las auxinas y las citocininas. Estos tejidos representan zonas meristemáticas y tejidos jóvenes en general. (Akin-Idowu y col., 2009). La elección de material de explante también determina el riesgo de contaminación microbiana. Las diferencias específicas en el potencial de regeneración a órganos asocian los estados de la célula en el ciclo celular (Akin-Idowu y col., 2009; Benson, 2000).

### 5.1.3. Otros factores

El pH del medio puede influir en los patrones de crecimiento y estabilidad de cultivos. Usualmente se ajustan el pH del medio de cultivo a valores ácidos (rango de pH 5-6) puesto que permite la biodisponibilidad de los nutrientes que componen al medio de cultivo. Factores físicos como tamaño del recipiente de cultivo y aireación, calidad de luz, duración del fotoperíodo y temperatura también tienen influencia sobre el cultivo (Benson, 2000). Por ejemplo, cultivos de callo y cultivos en suspensión puede crecer en diferentes pH, aunque el pH de la mayoría es ajustado a un rango de 5.0-6.0, permitiendo un mejor crecimiento a un pH de 5.8 (Banthorpe y Wirzt-Justice, 1972).

## 6. *Tanacetum parthenium*

### 6.1. Descripción

*Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. (Sinónimos, *Matricaria parthenium* L., *Chrysanthemum parthenium* (L.) Bernh.) es una planta herbácea perenne, muy aromática al estrujarse, hasta de 80 cm de alto, pubérula en los tallos más jóvenes, hojas e involucros; tallos más o menos ramificados, erectos; hojas bipinatífidas, de contorno elíptico, hasta de 8 cm de largo; con  $\pm$  50 brácteas, las exteriores lineales, las interiores oblongas, hasta de 4 mm de largo; receptáculo convexo o hemisférico; las flores liguladas 10 a 21 (algunas formas cultivadas se observa más), sus corolas blancas, las láminas oblongas de 2.5 a 8 mm de largo; con  $\pm$  250 flores de disco, sus corolas amarillas, tubulosas de  $\pm$  1.5 mm de largo; la forma de aquenios es cilíndricos, de  $\pm$ 1.5 mm de largo,

provistos de 5 a 10 costillas, glabros, vilano en forma de corona diminuta (Knight, 1995; ZiQi y col., 1999; Rzedowski y col., 2005) (Figura 4). Se le conoce como “Hierba de Santa María”, “Santa María”. Es nativa de Europa y Asia y fue naturalizando en África, Australia, Europa, Norte Americana, y América del Sur (USDA, 2014). Crece a una Altitud de 2250-2550m (Rzedowski y col., 2005). Su taxonomía comprende:

Tribu: Anthemideae

Subtribu: Anthemidinae

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Las plantas del género *Tanacetum* L., consisten de alrededor de 160 especies y es el tercer género de la compositae-Anthemideae seguida de las especies del género *Artemisia* L. (522spp) y *Anthemis* L. (175spp) (Sonboli y Oberprieler, 2012; Brow y col., 1996); comprende especies herbáceas perennes o anuales y algunos subfrutescentes, con frecuencia aromáticas al estrujarse (Rzedowski y col., y col., 2005). A través de estudios previos, el compuesto activo de especies del género *Tanacetum* (e.g. *T. polycephalum*, *T. gracile* y *T. parthenium*) ha mostrado ser citotóxico contra varios tipos de cáncer (Karimian y col., 2014). Dicho compuesto, es un sesquiterpeno tipo lactona denominado partenolida (PT) (Cheng y Xie, 2011). La partenolida es acumulada a través en glándulas bilobuladas encontradas en la superficie de las partes aéreas (Brow y col., 1996), y es el mayor constituyente del total de sesquiterpenos de *T. parthenium* (L.).



Figura 4. Planta de *Tanacetum parthenium*.

## 6.2. Usos

La “Santa María” ha sido reconocida desde tiempos antiguos por las propiedades medicinales benéficas, y utilizada también como ornamental (Rzedowski y col., 2005; Knight, 1995). Esta planta crece comúnmente en los jardines y ha sido usada como remedio para el tratamiento de varias enfermedades incluyendo artritis, fiebre y migraña (Barsby y Salan, 1992). Otros de los síntomas que alivia son la soriasis, dolor de dientes o muelas, picadura de insectos, reumatismo, asma, dolor de estómago, problemas menstruales, para limpiar el hígado, úlceras bucales, irritación de la piel, dolor abdominal, indigestión, problemas urinarios, antiespasmódica, tónica, contra el vómito, la diarrea y la inflamación, conocida como aspirina medieval (Castañeda-Acosta y col., 1995; Knight, 1995).

### 6.3. Metabolitos secundarios producidos en *T. parthenium*

*T. parthenium* contiene compuestos tipo fenólicos y terpenoides. Al primer grupo pertenecen los flavonoides como la luteína y apigenina; la apigenina se reporta con actividad significativa en la inhibición de tumorigénesis en piel de ratón y la luteína ha mostrado fuerte inhibición en el crecimiento de MCF-7 (William y col., 1999; Wu y col., 2006). Las hojas y flores contienen algunos flavonoides lipofílicos tales como la quercetagenin 3,4-di-metil éter, 6-hidroxicaemferol 3,6-dimetil-eter, y 6-hidroxicanferol 3,6,4'-trimetil éter (santin). Santin se reporta con actividad antiinflamatoria (William y col., 1999). La composición exacta fenólica de los compuestos es crucial para la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, valores nutricionales, aplicación potencial, estudios epidemiológicos y clínicos elaborando su efecto potencial de salud (Wang y col., 2014).

Compuestos ácidos de fenólicos (ácidos 3-5-, 4-5- y 3-4-di-O-cafeoilquinico; DCQAs) se han purificado de *T. parthenium*. En la parte aérea se ha determinado (g/kg de materia seca) al ácido clorogénico 6.45 g/Kg (de hojas), 3-5-DCQA (30.08 g/Kg), 4-5-DCQA (5.61 g/Kg), derivados totales de cafeol (42.14 g/Kg), derivados totales de ácido dihidroxicinámico (57.21 g/Kg), flavonoides totales (13.97 g/Kg), y total de compuestos polifenólicos (81.12 g/Kg) (Fraisie y col., 2011; Lim, 2014).

Las partes aéreas de *T. parthenium* también contienen una rica mezcla de terpenoides tipo mono y sesquiterpeno ( $\alpha$ -metilenbutirolactonas) (los más abundantes monoterpenos) tales como el germacrano D, B-farneseno y alcanfor. El B-farneseno y el biciclogermacrano también están presentes en las raíces de la planta (Makheja y Baley,

1982). Los principios activos biológicos más importantes son los sesquiterpenos tipo lactona, particularmente la partenolida, principal constituyente en una proporción de 85% del contenido total de sesquiterpenos (Pareek y col., 2011). Existe una amplia variación en las concentraciones de partenolida en las diferentes partes de la planta. El mayor contenido de partenolida ha sido encontrado en cabezas de flores (1.38%), seguido de las hojas (0.95%) y con solo 0.08% en los tallos y 0.01% en las raíces (Heptistall y col., 1992). Se cree que la partenolida se acumula en glándulas bilobuladas en la superficie aérea de la planta. Se sabe que la partenolida varía marcadamente en plantas que crecen en diferentes hábitats geográficos, además de que está asociada con el estado de desarrollo de la planta. Se muestra que flores maduras y semillas en invernadero tienen altas concentraciones de partenolida. Es posible que el alto nivel de partenolida en las hojas apicales comparadas a las maduras se deba a la presencia de un gran número de tricomas (Brow y col., 1996). Por otro lado, en extracciones convencionales se determinó al metanol como aquel solvente que extrajo la mayor cantidad de partenolida (Makheja y Baley, 1982). Además, se ha observado que la liofilización y el secado natural no influyen en el rendimiento de la extracción de partenolida (Hendricks y col., 1997).

#### **6.4. Cultivo *in vitro* y producción de partenolida**

Los reportes sobre cultivos *in vitro* de *Tanacetum parthenium*, comprenden la producción de partenolida en cultivos de brotes, raíces transformadas, callo y células en suspensión, siendo en términos generales la producción de dicho metabolito significativamente mayor en brotes (específicamente en hojas apicales) (Brown y col., 1996; El-Shamy y col., 2007;

Kisiel y Stojakowska, 1997; Keskitalo y col., 1995; Rateb y col., 2007;). Existen reportes sobre cultivo *in vitro* de *T. parthenium*, principalmente enfocados a la producción de partenolida. En cultivo de callo no fue detectada la partenolida, produciendo solamente un precursor (Brown y col., 1996). En cultivos de células en suspensión no se detectó acumulada a la partenolida. El cultivo de explantes para 90 días en medio libre de reguladores (MS0) desarrollo retoños a partir de brotes axilares, incrementando su peso (Brow y col., 1996). Cultivos de callo de *T. parthenium* produjeron una cantidad significativa de dos coumarinas, escopoletina e isoflaxina junto con estigmasterol y sitosterol (Banthorpe y Brown 1986). La regeneración de plantas, vía organogénesis, a partir de explantes de hojas jóvenes de Matricaria, permitió a las plantas regeneradas la capacidad de producir partenolida (Brow y col., 1996).

Por otra parte la suplementación del medio de cultivo con sacarosa en concentraciones de 50-60 g/L, promovió el crecimiento del brote y la acumulación de partenolida en las hojas en una concentración máxima de  $2.64 \pm 0.08$  % peso seco (Brow y col., 1999). Se ha reportado que en toda la planta, el exceso de carbono está dirigido a la biosíntesis de carbono basado al metabolismo secundario (Brow y col., 1996). Por otra parte El-Shamy y col. (2007) probó el efecto de fuentes de carbono sobre la producción de partenólida en cultivos de callo, y al suplementar el medio de cultivo MS con glucosa a concentración de con 50g/L se determinó una concentración de 0.127mg/g (0.013%) no encontrándose diferencias significativas al usar fructuosa (50g/L). Además en el uso de reguladores de crecimiento ANA 0.5 mg/L y bencilaminopurina (BAP) 0.5mg/L produjo una acumulación considerable de partenolida (0.099 y 0.074 mg/g, respectivamente). Altas concentraciones

de ANA y BAP (1 o 2mg/L) incrementaron la formación de callos, proponiendo los autores que una baja concentración de RCV a mitad de concentración de medio MS puede incrementar la producción de partenolida.

Sin embargo, no existen reportes de cultivos *in vitro* de *Tanacetum parthenium* referentes a caracterización tanto del crecimiento como de la producción de compuestos bioactivos como partenolida y compuestos fenólicos. En el presente proyecto de tesis se indujeron brotes mediante la adición de RCV en plántulas de *T. parthenium*, caracterizándose el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios como el ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido clorogénico, ácido salicílico, quercitina y partenolida, asociados al potencial de esta especie como fuente de compuestos bioactivos contra el cáncer.

## **V. OBJETIVOS**

### **General:**

- Establecer cultivos *in vitro* de *Tanacetum parthenium* para caracterizar el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios.

### **Específicos:**

- Establecer cultivos asépticos de explantes nodales inmaduros de *Tanacetum parthenium* y, a partir de sus yemas axilares, desarrollar brotes empleando medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

- Individualizar los brotes desarrollados de *Tanacetum parthenium* para la obtención de plántulas a través de su transferencia a medio de cultivo adicionado de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) 0.05 mg/L
- Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) ácido naftalenacético (ANA) 0.05 mg/L y cinetina (KIN) 0.5 mg/L sobre la multiplicación de brotes en plántulas de *Tanacetum parthenium*
- Cuantificar, durante 30 días, en 4 intervalos, el contenido de metabolitos secundarios como: Partenolida, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido clorogénico, ácido salicílico y quercetina, en plántulas de *Tanacetum parthenium* tratadas con RCV

## VI. HIPÓTESIS

La aplicación de reguladores de crecimiento (ANA 0.05 mg/L y KIN 0.5 mg/L) promoverá la inducción *in vitro* de brotes en plántulas de *Tanacetum parthenium* productoras de metabolitos secundarios bioactivos.

## VII. METODOLOGÍA

### 1. Material biológico

Plantas de un tamaño aproximado de 15 cm altura de *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. (Número de registro 78435, Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa) fueron cultivadas en condiciones de invernadero. Tallos de aproximadamente

8 cm (conteniendo los segmentos apicales y cerca de 5 a 7 nodos) fueron fuente de explantes para el establecimiento de cultivos asépticos.

## **2. Medio de cultivo y condiciones de incubación**

El medio de cultivo consistió de la formulación descrita por Murashige y Skoog (MS, 1962) al 50% de su composición, adicionada de glucosa 40g/L. El medio de cultivo fue adicionado de ácido naftalenacético (ANA) 0.5 mg/L (equivalente a 2.6 $\mu$ M) para promover rizogénesis en yemas axilares elongadas y así obtener plántulas, mientras que cinetina (KIN) 0.5 mg/L (equivalente a 2.3 $\mu$ M) en combinación con ANA 0.05 mg/L (equivalente a 0.26 $\mu$ M) fueron adicionadas al medio de cultivo para inducir brotes en plántulas. Una vez adicionados todos los componentes del medio de cultivo, se ajustó el pH a valores de 5.7-5.8 con soluciones NaOH o HCl 1.0N. Las condiciones de incubación para los cultivos consistieron de un fotoperiodo de 16 h luz (50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; luz fluorescente blanca) a 26  $\pm$  2 °C.

## **3. Cultivos asépticos**

Las hojas de los tallos fueron removidas, y dicho tallo fue desinfectado superficialmente en inmersiones secuenciales en: 1) solución jabonosa durante 15 min (se enjuagó con agua destilada); 2) solución de Etanol al 70% (v/v) por 30 seg; 3) cloro comercial al 20% (equivalente al 1.2% de hipoclorito de sodio) por 15 y 30 min; 4) enjuague en 4 repeticiones con agua destilada estéril en condiciones asépticas; 5) solución antioxidante estéril (ácido ascórbico 150 mg/L) por 5 min. Los nodos fueron segmentados a partir de los tallos desinfectados en caja Petri, conteniendo solución antioxidante, para luego ser

inoculados en posición vertical en tubos de ensaye conteniendo 15 ml de medio de cultivo previamente preparado. Los nodos fueron incubados durante 30 días para la elongación de yemas axilares que, posteriormente, fueron transferidos a nueva formulación de medio de cultivo para promover rizogénesis, incubándose por 30 días. Las plántulas resultantes fueron transferidas a medio de cultivo nuevo para la inducción de brotes.

#### **4. Multiplicación de brotes**

Las plántulas fueron transferidas a medio de cultivo adicionado de ANA 0.05 mg/L en combinación de KIN 0.5 mg/L. Un tratamiento control fue evaluado en plántulas crecidas en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento vegetal. Las plántulas fueron incubadas durante 30 días, efectuándose de 4 a 7 tomas de muestras a lo largo de dicho período de incubación, donde se determinó la formación de nuevos brotes y hojas así como la longitud del tallo principal. Los órganos fueron separados y secados en un cuarto oscuro, seco y a temperatura ambiente. Determinaciones de peso seco fueron llevadas a cabo para cada órgano cosechado.

#### **5. Extracción y análisis cuantitativo de metabolitos secundarios**

El análisis fitoquímico de metabolitos secundarios consistió en extraer la biomasa seca con Metanol (MeOH) (50ml MeOH por cada 200 mg de biomasa seca) en reflujo durante 30 min. Los extractos resultantes fueron empleados para determinar ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido clorogénico, ácido salicílico, quercitina y partenolida en equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography,

HPLC) Agilent serie 1100 equipado con bomba cuaternaria (DAD, G1315B, Alltech Co.USA) y una columna C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; supelco, sigma). Cada extracto se filtró (membranas de nylon de 0.45 $\mu$ m) previo a la inyección en equipo HPLC. Se utilizó como fase móvil una solución de ácido acético al 0.3% (fase A), Acetonitrilo (fase B) y Agua (C); el volumen de inyección fue de 20 $\mu$ l, flujo de 0.7 ml/min y el detector fue operado a la longitud de onda de 214, 330 y 350 nm. El ácido rosmarínico fue empleado como estándar interno. El método utilizado para el análisis fue el siguiente:

Tabla 3. Metodología empleada para la cuantificación de metabolitos secundarios en gradiente para HPLC

Tiempo (min)	% A	%B	%C
0	100	0	0
12	75	25	0
30	65	35	0
32	60	35	0
35	0	40	60
40	0	55	45
45	0	100	0

Se emplearon estándares de cada uno de los compuestos para construir curvas patrón (40-200 microgramos/mL) (Sigma-Aldrich, USA: Partenolida, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido clorogénico, ácido salicílico y quercetina). El tiempo de retención y el área del pico fueron datos empleados para detectar, identificar y cuantificar los compuestos de interés en los extractos.

## **6. Análisis estadístico**

Cada unidad experimental consistió de tres repeticiones, cuyos resultados fueron sujetos a un análisis estadístico consistiendo de un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey de comparación entre medias al 5% del nivel de probabilidad. Para tales fines, se usó el software estadístico NCSS versión 5 (WireframeGraphics, Kaysville, UT).

## **VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Establecimiento de cultivos asépticos.**

La técnica del cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales permite manipular las condiciones nutricionales y ambientales para que a través de explantes de vegetales se promueva el desarrollo de diferentes tipos de cultivos y aplicaciones. Una etapa crucial para ello, es el establecimiento de cultivos asépticos pues se trata de eliminar microorganismos presentes en los explantes que influyen en su desarrollo por competencia de recursos. Por lo anterior, existe la necesidad de eliminar estos factores a través del establecimiento de condiciones asépticas de los cultivos (Olivera-Ortega y col., 2000).

Para el establecimiento de cultivos asépticos de explantes nodales de *T. parthenium* se evaluó la eficiencia de cloro comercial al 20% (v/v) (equivalente a 1.2% v/v hipoclorito de sodio) además de diferentes tiempos de exposición (15 y 30 minutos). La concentración del 20% de cloro comercial permitió el crecimiento de microorganismo en un 20% de los explantes evaluados, no existiendo diferencia significativa en los tiempos de exposición

probados. Banthorpe y Brow (1990) realizaron tratamiento aséptico con 1% de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) por 15-25 min sobre explantes de hoja de *T. parthenium* con el objetivo de obtener cultivos de callo. Los brotes apicales de *Tanacetum parthenium* fueron desinfectados superficialmente con cloro comercial a un 8.0% por 30 min (Brow y col., 1996) para el establecimiento y mantenimiento de cultivos de brotes. En otros reportes, para el establecimiento de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de *T. parthenium* hacen uso de semillas para la obtención de explantes, como lo realizado por Rateb y col. (2007), Banthorpe y col., (1986) y Lai-king y Brown., (1999), aunque únicamente estos últimos autores mencionan que la desinfección de la semilla se hizo con hipoclorito de calcio 2% por 10 min. En otras especies pertenecientes al género *Tanacetum* como *T. vulgare* L., Keskitalo y col. (1995) hacen uso de hipoclorito de calcio 7.0% por 20 min en brotes apicales y axilares para su desinfección. En *Tanacetum balsamita* se realizó una limpieza superficial de los tejidos con hipoclorito de sodio 2.5% (Mohajjel y col., 2010). Sin embargo, en los trabajos previamente mencionados sobre *Tanacetum sp.* no se reporta una evaluación de la concentración y tiempo de exposición del agente desinfectante, debido posiblemente a una realización previa y únicamente describen la concentración que resulto más eficiente. Trabajos para algunas especies de la misma familia a la cual pertenece *T. parthenium* evalúan la concentración y tiempo de exposición de los explantes, mientras que otros solo describen un tratamiento. Hailu y col. (2013) realizaron el tratamiento de desinfección en explantes nodales de *Artemisia annua*, donde se probó combinaciones de concentraciones de 0.5-2% con un tiempo de exposición de 10-25 min, determinándose el mejor resultado con 1.5% de NaOCl por 20 min. Almaarri y Yu

xie (2010) reportan el uso de 20% de cloro comercial (equivalente a 1.05% de NaOCl) por 15 min para la desinfestación de brotes apicales y explantes nodales de *Artemisia annua*. Evaluar hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión así como variaciones de los mismos permite conocer su efecto sobre la eliminación de microorganismo y la sobrevivencia de explantes.

Por otro lado, durante el subcultivo de explantes de *T. parthenium* que no presentaron contaminación se obtuvo un porcentaje del 60% viable debido a que el resto presentó cambios fenotípicos por obscurecimiento en regiones de segmentación (Figura 5) provocando la muerte del explante. Se considera a la manipulación de los explantes como la generación de heridas por corte de material vegetal un estrés, causando cambios fisiológicos en la planta, que pueden propiciar necrosis de los tejidos (Olivera-Ortega y col., 2000; León y col., 2001). La oxidación de explantes en cultivos iniciales es una causa frecuente de recalcitrancia temprana *in vitro* en tejidos que pueden contener altas concentraciones de compuestos fenólicos. También es probable que los componentes específicos de los medios de cultivo de tejidos (iones metales) puedan aumentar la oxidación de fenoles. Los síntomas incluyen el rápido pardecimiento o ennegrecimiento de los tejidos afectados y esto puede dar lugar a necrosis de los tejidos y en los casos más extremos, la muerte del explante. La necrosis de tejido también puede asociarse al tratamiento con cloro (hipoclorito de sodio), debido a que el ingrediente químico oxidante puede matar al tejido al incrementar la concentración y el tiempo de exposición (Borges y col., 2009; Hailu y col., 2013; Sánchez y Salaverria 2004). El uso de antioxidantes puede implementarse para evitar oxidación del explante (Benson 2000). Durante el

establecimiento de cultivos asépticos de *T. parthenium* el uso de ácido ascórbico como antioxidante no controló por completo la oxidación en los explantes.

Los explantes de *T. parthenium* que permanecieron viables después del subcultivo fueron incubados para propiciar la elongación de las yemas axilares. Posteriormente se transfirieron a nuevo medio de cultivo para la inducción de raíces, de los cuales solo el 66% respondieron al estímulo de RCV de generación de raíces. El 34 % de los explantes de *T. parthenium* que no fueron capaces de responder al estímulo de RCV para formar raíz se debió posiblemente a la recalcitrancia, es decir la incapacidad de las células, tejidos y órganos para responder a la manipulación del CTV (Benson, 2000). La familia Asteraceae ha sido reportada como recalcitrante (Keskitalo y col., 1995), a la cual pertenece la especie *T. parthenium*.



Figura 5. Características fenotípicas de explantes nodales de *Tanacetum parthenium* observadas después de tratamiento para establecer cultivos asépticos.

## **2. Inducción de brotes, hojas y crecimiento en plántulas *in vitro* de *T. parthenium***

El uso de RCV ANA y KIN a una concentración de 0.05 mg/l (0.26 $\mu$ M) y 0.5mg/l (2.3 $\mu$ M), respectivamente, incrementó en plántulas de *Tanacetum parthenium* el número de

brotos, longitud de las plantas y el número de hojas comparado con el control (libre de RCV) (Figura 6). El mayor desarrollo de brotes ocurrió a partir del día 24 al 30, mostrando diferencia significativa al compararse con el control. El número de brotes inducidos por plántula tratada con los RCV fue de 11-13 (longitud en promedio de 1.5 a 2 cm) contra 4 inducidos en el control (Figura 7). Brow y col. (1996) en explantes de tallo de *T. parthenium* crecidos en medio de cultivo libre de reguladores reportan la inducción de un brote por explante. Rateb y col. (2007) en diversos explantes de *T. parthenium* determinan un efecto de los RCV sobre el tipo de respuesta inducida; una producción de 2.89 brotes en explante nodales con 0.5mg/L de BAP y 0.05 mg/L de ANA, mientras que en concentraciones de 1mg/L tanto para BAP como ANA se indujo callo en explantes de raíz, cotiledones, nodos y brotes apicales. El tratamiento con 4.44 $\mu$ M de BA y 0.54 $\mu$ M de ANA en explantes nodales de *T. Parthenium* indujo 6.6 brotes comparado con explantes libres de reguladores los cuales indujeron solo uno (Stojakowska y Kiesel 1997). En otras especies de la familia Asteraceae, en explantes nodales de *Artemisia absinthium*, 0.5mg/L de BAP indujo 35 brotes mientras que el control formó 1 brote después de 30 días de cultivo; pero observaron que un número alto de brotes inducidos va en deterioro de la calidad, debido a que se necrosaron y etiolaron dichos brotes (Rodríguez y col., 2003). Gopinath y col., (2014) en brotes axilares de *Artemisia annua* usaron combinaciones de 0.5-2mg/L de BAP y 0.5 de ANA; la combinación consistiendo de 1.5mg/L de BAP y ANA 0.5mg/L indujo la mayor formación de brotes por explante (27.7). En brotes apicales de *Artemisia pallens* un incremento de KIN (1.0, 1.5 y 2.0) incrementó la formación de brotes (5.75, 6 y 9 respectivamente) así como el porcentaje de explantes presenta esta respuesta

(66, 74 y 64 respectivamente) respecto al total de los explantes evaluados. Sin embargo, al combinar KIN con ANA el aumentar la concentración de ANA (0.25, 0.5 y 1.0mg/L) disminuyó la formación de brotes e incrementó el porcentaje de respuesta (75,88 y 92 % respectivamente) (Nathar y Yattoo 2013). En explantes de hoja de *Chrysanthemum* cv. tratados con 1 mg/L de BA y 2 mg/L de ANA se indujo 12.3 brotes en 45 días, mientras que el control no generó brotes (Htay y col., 2014). En los brotes apicales de *Chrysanthemum cinerariaefolium* tratados con 0.9  $\mu$ M de BA se indujo 21.5 brotes, y al combinar con NAA (0.1 $\mu$ M) se indujo 11.2 brotes en un periodo de 30 días, (Wambugu y Rangan, 1981). La administración de reguladores de crecimiento vegetal, principalmente el uso de citocininas, es importante para inducir el desarrollo y proliferación de nuevos brotes.

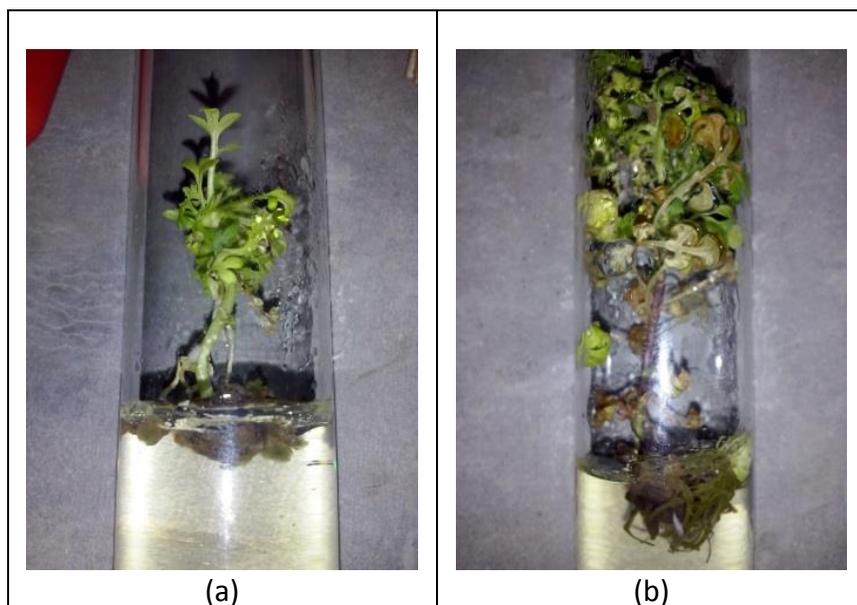


Figura 6. Plántulas *in vitro* de *Tanacetum parthenium* cultivadas durante 30 días. (a) Plántula libre de RCV, (b) plántula en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente).

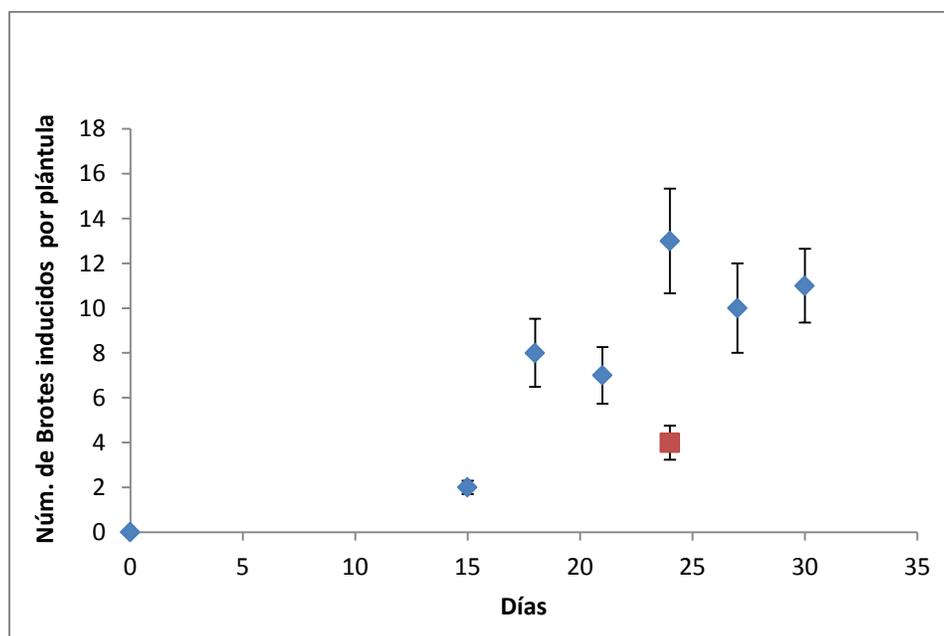


Figura 7. Número de brotes inducidos en plántulas de *Tanacetum parthenium* cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (◆) Cultivo en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente). Los datos presentados representan la media  $\pm$  desviación estándar.

La mayor proliferación de hojas inducidas ( $109 \pm 21$  hojas) en las plántulas de *T. parthenium* se registró al día 24 y se mantuvo constante en los días de cultivo 27 ( $90 \pm 15$  hojas) y 30 ( $85 \pm 17$  hojas). Sin embargo, luego de 24 días, se observó que las hojas más viejas (que se encontraban en la parte inferior) presentaron indicios de clorotización (Figura 6) posiblemente como signo de deficiencia de nutrientes aunque los RCV seguían induciendo la formación de nuevos brotes. Las plántulas cultivadas en medio libre de RCV al día 24 presentaron menor producción de hojas ( $60 \pm 10$ ) comparada con la plántulas tratadas con RCV (Figura 8). Sin embargo, comparando el tamaño de hojas desarrolladas en plántulas tratadas con RCV con aquellas, éstas no fueron estadísticamente diferentes (Figura 9). Rateb y col. (2007) obtuvieron 15 hojas por brote inducido en explantes de brotes apicales de *T. parthenium* tratados con 0.5 mg/L de BAP + 0.05mg/L de ANA.

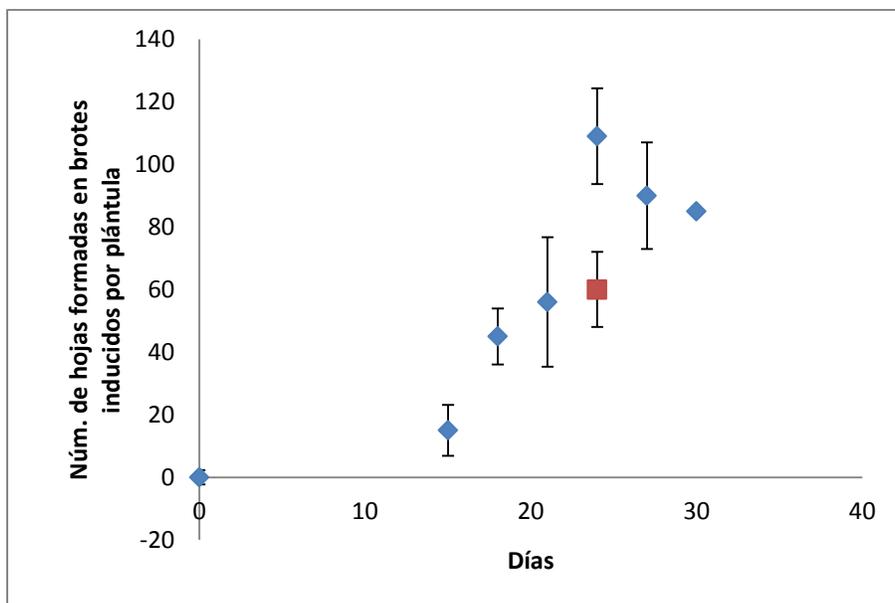


Figura 8. Número de hojas formadas en brotes inducidos en las plántulas de *Tanacetum parthenium* cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (◆) cultivo en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente). Los datos presentados representan la media  $\pm$ desviación estándar.

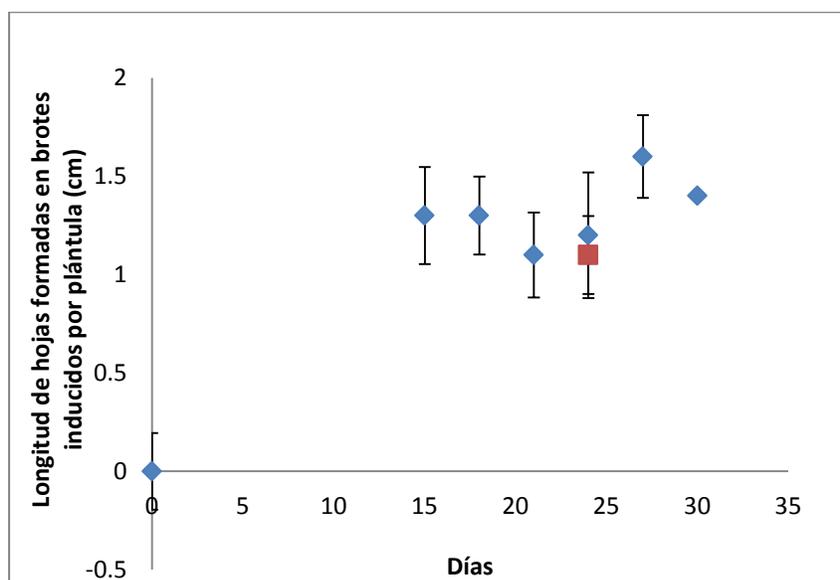


Figura 9. Longitud de hojas formadas en brotes inducidos en las plántulas de *Tanacetum parthenium* cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (◆) cultivo en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente). Los datos presentados representan la media  $\pm$ desviación estándar.

Asimismo, el uso de RCV tuvo efecto en la longitud del tallo principal de plántulas de *T. parthenium*, existiendo diferencia significativa entre las medias observadas comparadas con el control (Figura 10). Para el día 24 se registró el mayor crecimiento ( $7.5 \pm 1.4$ cm), el cual fue aproximadamente el doble del tamaño respecto al control ( $4 \pm 0.7$ cm).

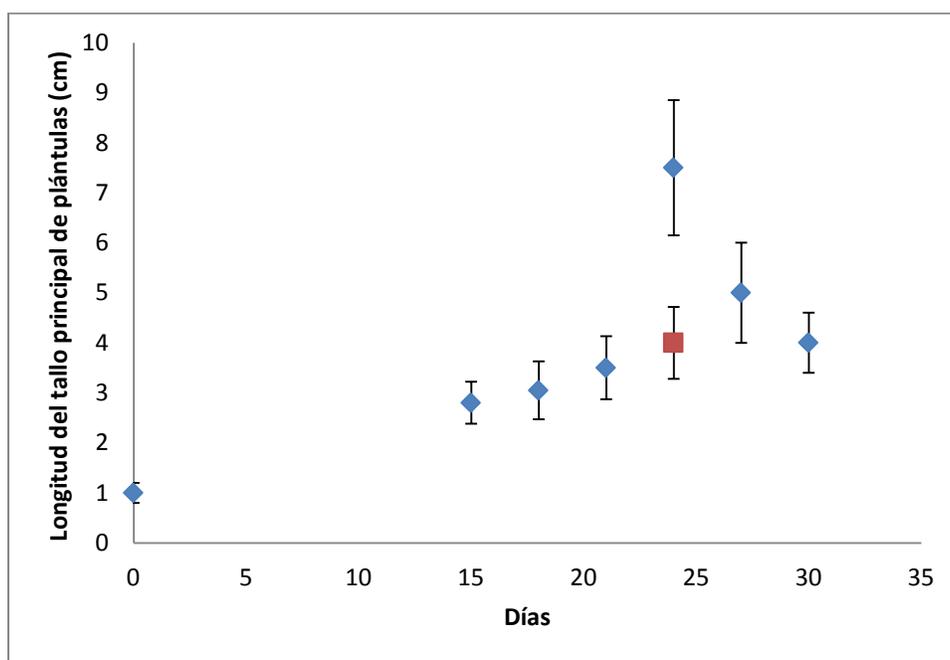
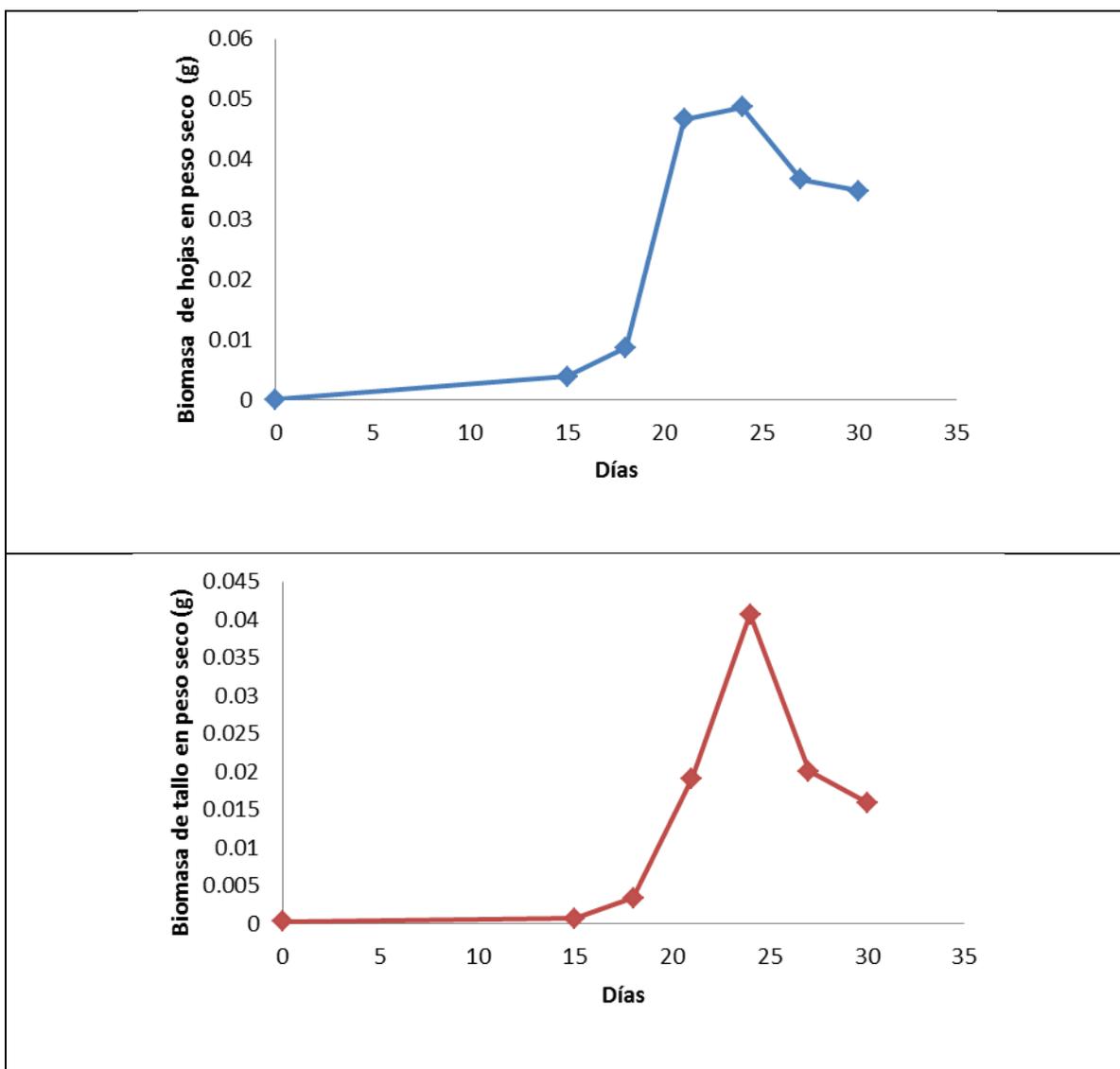


Figura 10. Longitud del tallo desarrollado en plántulas de *Tanacetum parthenium* cultivadas durante 30 días. (■) Cultivo en medio libre de RCV, y (◆) cultivo en medio con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente). Los datos presentados representan la media  $\pm$ desviación estándar.

Por otro lado, determinaciones del peso seco efectuadas en tallo, hoja y raíz mostraron que la biomasa no se vio incrementada del día 0 al día 5 mientras que a partir de este último día hasta el día 21 o 24 se observó un crecimiento, obteniéndose la mayor cantidad de biomasa para hoja al día 21, mientras que para tallo y raíz al día 24. En el periodo del día 21 al 30 la biomasa de hoja se mantuvo constante, mientras que del día 24 al 30 para

tallo y raíz tendió a disminuir, señalando que los cultivos se encontraban en fase estacionaria o de muerte (Figura 11). Determinaciones del peso fresco de la parte aérea de la plántula de *T. parthenium* con RCV al día 24 resultaron en un peso de  $498.5 \pm 94.75$  mg ( $n=3$ ). Brow y col. (1996) reportó un peso fresco de  $1262 \pm 144$ mg ( $n=5$ ) de explantes de tallo después de 90 días de cultivo obtenidos después de tres subcultivos.



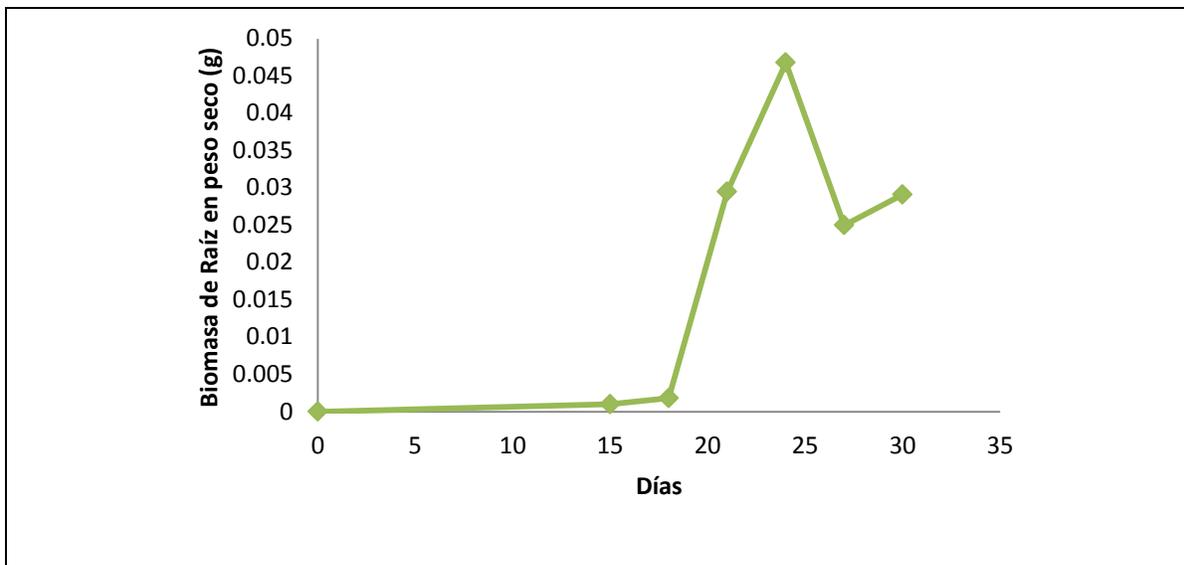


Figura 11. Biomasa en peso seco de los órganos desarrolladas *de novo* en plántulas de *Tanacetum parthenium* tratadas con RCV (ANA y KIN, a 0.05 mg/l y 0.5mg/l, respectivamente) cultivadas durante 30 días. (■) Hoja, (■) Tallo y (■) Raíz. Los datos presentados representan la media  $\pm$  desviación estándar.

### 3. Producción de metabolitos secundarios en órganos de plántulas de *T. parthenium* cultivadas *in vitro* con RCV

En el análisis realizado los días 21, 24, 27 y 30 en tejidos de raíz, tallo y hoja de plántulas *in vitro* de *T. parthenium* cultivadas con RCV (KIN 0.5 mg/L y ANA 0.05 mg/L) para la identificación de metabolitos secundarios (ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido clorogénico, ácido salicílico, quercitina y partenolida), por HPLC se determinó la producción de ácido clorogénico, ácido cafeico, y ácido salicílico. Dichos compuestos se identificaron en las muestras al comparar los tiempos de retención (Tr) en minutos, obtenidos de los estándares correspondientes a: ácido clorogénico con Tr de  $13.05 \pm 0.05$  min; ácido cafeico con Tr de  $15.25 \pm 0.03$  min, y ácido salicílico con Tr de  $23.65 \pm 0.33$  min. Asimismo, el hecho de que el ácido p-coumárico, quercitina y partenolida no se hayan detectado no implica necesariamente que éstos no se estuvieran produciendo ya que la

cantidad de biomasa analizada en los experimentos pudo limitar la concentración de estos en los extractos y en consecuencia no ser detectados en el HPLC.

Se identificó al ácido clorogénico (AC) en hoja a los 4 días analizados (21,24, 27 y 30), mientras que en tallo y raíz a los días 21,24 y 30. En general, en hoja, tallo y raíz la mayor concentración de AC se determinó al día 21 (2.5, 1.9 y 1.2 mg/g, respectivamente), mientras que la menor cantidad de AC ocurrió al día 30 en hoja (0.5 mg/g) y al día 24 en tallo y raíz (0.1 y 0.6 mg/g, respectivamente) (Tabla 4). Similar al AC, el ácido cafeico (ACaf) se identificó en hojas en todos los días analizados, mientras que en tallo y raíz a los días 21 y 30, además del día 24 en tallo. La mayor cantidad de ACaf se determinó al día 21 para los tres órganos (0.78, 0.27 y 0.49 mg/g para hoja, tallo y raíz, respectivamente) y la menor cantidad al día 30 en hoja, raíz (0.06, y 0.23 mg/g, respectivamente) y en tallo al día 24 (0.01mg/g). Se detectó el ácido salicílico en hojas al día 27 y 30, determinándose en mayor concentración al día 30 (2.9 mg/g), mientras que en raíz se detectó al día 21 y 30, en mayor concentración en el día 21 (0.3mg/g).

El ácido clorogénico y partenólida se cuantificaron en mayor cantidad en hojas que se encontraban en fase de crecimiento vegetativo comparada con la etapa de floración de plantas de *T. parthenium* crecidas en invernadero (Majdi, 2013). En el presente trabajo donde las plántulas pueden considerarse en estado de crecimiento vegetativo se determinó que las hojas tuvieron la capacidad de generar AC, además de ACaf y ácido salicílico (AS), quienes se producen en diferentes concentraciones en los periodos cortos de tiempo analizados (Tabla 4) que acorde a las determinaciones de biomasa (Fig.11) señalan su importancia en la final del crecimiento e inicios de la etapa subsecuente.

Asimismo, el mayor contenido de ácido clorogénico (2.5 mg/g) determinado en hojas cosechadas de plántulas cultivadas por 24 días es ligeramente menor al reportado en hojas de plantas de invernadero (6.45 g/Kg) (Fraise y col., 2011; Lim, 2014). El ácido clorogénico y sus derivados se producen en mayor cantidad durante un estrés por daño mecánico para la curación de heridas en tubérculos de papa (Torres-Contreras y col., 2014). La presencia de ácido clorogénico en plantas se puede asociar a la defensa y a la supresión de toxinas (Kuč y col., 1955; Wojciechowska y col., 2014), es un importante antioxidante para algunos cultivos así como en la dieta humana (Niggeweg y col., 2004). La identificación del AC en cultivo *in vitro* de *T. parthenium* podría contribuir a la salud humana debido a que este se ha asociado a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y la enfermedad de Alzheimer dada su actividad antibacterial, antiinflamatoria y antiviral (Wang y col., 2014). Adicionalmente, el AC actúa como compuesto protector, promoviendo una disminución en un 48% del daño inducido por radiación al DNA (Cinkilic y col., 2013) que podría contribuir a combatir el cáncer. No existen reportes que estudien AC en cultivos *in vitro* para *T. parthenium*, posiblemente debido a que se han estudiado compuestos importantes como los sesquiterpenos, debido a su importancia en actividad biológica contra el cáncer.

Tabla 4. Contenido de principales metabolitos secundarios producidos en órganos de plántulas de *T. parthenium* tratadas con RCV durante 30 días de cultivo.

Órgano	Día	Ácido Clorogénico (mg/g biomasa)	Ácido cafeico (mg/g biomasa)	Ácido salicílico (mg/g biomasa)
HOJA	21	2.52±0.45b	0.78±0.2c	ND
HOJA	24	2.67±0.35b	0.40±0.06b	ND
HOJA	27	0.65±0.1a	0.35±0.07b	0.48±0.09a
HOJA	30	0.55±0.11a	0.06±0.1a	2.93±0.88b
TALLO	21	1.94±0.33c	0.27±0.05c	ND
TALLO	24	0.11±0.03a	0.01±0.01a	ND
TALLO	27	ND	ND	ND
TALLO	30	1.33±0.21b	0.11±0.02b	ND
RAIZ	21	1.24±0.24b	0.50±0.07b	0.31±0.06b
RAIZ	24	0.67±0.11a	ND	ND
RAIZ	27	ND	ND	ND
RAIZ	30	0.75±0.15a	0.24±0.05a	0.18±0.05a

ND- No se detectó. Los datos presentados representan la media  $\pm$  desviación estándar. Mismas letras señaladas después de la desviación estándar indican que estadísticamente no existen diferencias entre las medias comparadas en función al tipo de compuesto analizado en cada órgano.

Los ácidos hidroxicinámicos como el ácido caféico (ACaf), p-cumarico, ferúlico y sinápico están presentes prácticamente en todos los vegetales (predominante el ácido cafeico) y pueden estar distribuidos en toda la planta (Chen y Ho, 1997; Soto-Vaca y col., 2012). De los ácidos hidroxicinámicos (ACaf y p-cumarico) analizados en órganos de plántulas *in vitro* de *T. parthenium* tratadas con RCV se identificó únicamente al ACaf, mostrando su predominancia en los órganos de *T. parthenium*. Además, la alta concentración de este compuesto observada al día 21 indica su posible función de defensa en la etapa final de la fase de crecimiento e inicial de la fase estacionaria ante el estrés que podría haber ocurrido por deficiencia de nutrientes. Dicho estrés pudo haber aumentado de manera

severa al día 30 que contribuyó a encontrarlo en baja concentración, asociándolo tal vez en parte a su participación en la producción de fenólicos complejos como por ejemplo la apigenina. Es de gran importancia la identificación y cuantificación de ACaf en plantas de uso medicinal debido a su actividad farmacológica, tales como la inmunomodulación, antiinflamación, antioxidante y antibacterial (Perumal y col., 2015). Por otra parte al ACaf se ha utilizado para el desarrollo de nuevos fármacos con potencial interés terapéutico en enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Silva y col., 2014; Soto-Vaca y col., 2012) y podría inhibir la formación de compuestos mutagénicos y carcinogénicos (Kuenzig y col., 1984).

El ácido salicílico (AS) es un regulador de crecimiento vegetal que participa en la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración y respuesta a estrés biótico y abiótico (Rangel y col., 2010; Dong y col., 2011). El AS es una molécula importante en la defensa contra invasión de patógenos (Wang y col., 2014). Se puede asociar la presencia del ácido salicílico en hojas y raíz en mayor contenido al día 30 de incubación como posible respuesta a estrés a causa de deficiencia de nutrientes en el medio de cultivo. Por otra parte, una de las aplicaciones médicas humanas del AS se asocia a su capacidad para reducir del riesgo de cáncer de colon (Zitta y col., 2012).

Aunque el AC, ACaf y AS se encuentran en la mayoría de las plantas, el presente trabajo pudo potenciar el desarrollo de partes áreas de *T. parthenium* inducidas *in vitro* en tratamiento con RCV (KIN 0.5 mg/L y ANA 0.05 mg/L), así como permitir un acercamiento a la producción de algunos metabolitos secundarios asociados a la propiedad terapéutica de la especie. Es de gran interés para cualquier análisis de investigación conocer los

tiempos en los que ocurre la mayor producción de metabolitos secundarios, además de encontrar un sistema el cual permita el máximo rendimiento de cultivos *in vitro*, principalmente con aplicaciones contra enfermedades humanas (Benson, 2000).

## **IX. Conclusiones**

Se estableció el cultivo aséptico de explantes nodales de *Tanacetum parthenium*, usando un proceso de desinfección con cloro al 20% (equivalente a una concentración 1.2% de hipoclorito de sodio) a un tiempo de exposición de 15 min. Siendo éste, un proceso sencillo y con una buena eficiencia para la desinfestación superficial del explante que promovió la eliminación de microorganismos en un 80% de los explantes evaluados.

Se obtuvo brotes nuevos del desarrollo de yemas axilares en medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento vegetal. Dichos brotes al ser transferidos a medio de cultivo adicionado 0.05 mg/L de ANA indujeron raíz en un 66% del total de los brotes evaluados, propiciando el desarrollo de plántulas.

Los RCV KIN 0.5 mg/L (equivalente a 2.3 $\mu$ M) y ANA 0.05 mg/L (equivalente a 0.26 $\mu$ M) promovieron una mayor producción de hojas (109 $\pm$ 20.71), brotes (13 $\pm$ 2.34), y elongación del tallo (7.5 $\pm$ 1.35 cm) en plántulas de *T. parthenium* cultivadas *in vitro*, comparada con el control (60 $\pm$ 10 hojas, 4 $\pm$ 0.76 brotes, 4 $\pm$ 0.72 cm de longitud del tallo).

Los metabolitos secundarios identificados por HPLC fueron ácido clorogénico (AC), ácido cafeico (ACaf) y ácido salicílico (AS). Se identificó AC en hoja, tallo y raíz. La mayor concentración de AC se determinó al día 21 para hoja, tallo y raíz, (2.5, 1.9 y 1.2 mg/g,

respectivamente) y la menor cantidad al día 30 en hoja (0.5 mg/g) y al día 24 en tallo y raíz (0.1 y 0.6 mg/g, respectivamente). La mayor cantidad de ACaf se determinó al día 21 para los tres órganos (0.78, 0.27 y 0.49 mg/g para hoja, tallo y raíz, respectivamente) y la menor cantidad al día 30 en hoja, raíz (0.06, y 0.23 mg/g, respectivamente) y en tallo al día 24 (0.01mg/g). El ácido salicílico se identificó en hojas al día 27 y 30, con mayor concentración al día 30 (2.9 mg/g) y en raíz al día 21 y 30, en mayor concentración al día 21 (0.3mg/g).

El compuesto de partenolida no se identificó en HPLC, posiblemente a una producción muy baja.

## X. LITERATURA CITADA

1. Akin-Idowu, P. E., Ibitoye, D. O., Ademoyegun, O. T. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology*. 8 (16). 3782-3788.
2. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., Walter, P. (2010). *Essential Cell Biology*. 3a ed. Garland Science. United States of America.
3. Ali, G., Hadi, F., Ali, Z., Tariq, M., Ali Khan, M. (2007). Callus induction and in vitro complete plant regeneration of different cultivars of tobacco (*Nicotina tabacum* L.) on media of different hormonal concentrations. *Biotechnology*. 6:561-566.
4. Almaarri, K., Yu Xie. (2010). *In vitro* direct organogénesis and micropropagation of *Artemisia annua*. *Journal of Biotechnology Vegetable*. 26:326-337.
5. Banthorpe, D. V., Brown G. D. (1986). Growth and Secondary Metabolism in Cell Cultures of *Tanacetum*, *Mentha* and *Anethum* Species in Buffered Media.
6. Banthorpe, D.V., Branch, S., Njar, V.C., Osborne, M.G., Watson, D.G. (1986). Ability of Plant Callus Cultures to Synthesize and Accumulate Lower Terpenoids. *Phytochemistry*. 25(3):629-636.
7. Banthorpe, D.V., Wirzt-Justice, A. (1972). Terpene Biosynthesis Part VI. Monoterpenes and Carotenoids from Tissue Cultures of *Tanacetum vulgare* L. *Journal Chemical Society*. Perkin Trans. 1769-1772.
8. Barsby, R., Salan, D., Knight, W., Hoult, J. (1993). Feverfew and vascular smooth muscle: Extracts from fresh and dried plants show opposing pharmacological profiles dependent upon sesquiterpene lactone content. *Planta Medica*. 59:20-25.
9. Benson, E.A. (2000). Special Symposium: *In vitro* Plant Recalcitrance *in vitro* Plant Recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular Development Biology*. 36:141-148.
10. Bone, K., Mills, S. (2013). *Principles and Practice of Phytotherapy*. 2a ed. Churchill Livingstone. ELSEVIER. United States of America.
11. Borges, M., Alarcón, Y., Malaurine, B., Hernández, Y., Silva, J.J. (2009). Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (Dioscoreae). *Revista Peruana Biológica*. 16(2):203-2

12. Bray, F. Jemal, A., Grey, N. (2012). Global cancer transition according to the human development index (2008-2030): a population-based study. *Lancet. Oncology*. 13:790-801.
13. Brow, A.M.G., Lowe, K., Davey, M., Power, J.B. (1996). Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) tissues culture and parthenolide synthesis.
14. Castañeda-Acosta, J., Cain, A.W., Fischer, N.H., Knopf, F.C. (1995). Extraction of bioactive sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* supercritical carbon dioxide and near-critical propane. *Journal Agriculture Food Chemical*. 43:63-68.
15. Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 49 (3):481-49.
16. Chen J. H., Ho C .T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal Agric. Food Chem*. 45:2374-2378.
17. Cheng, G., Xie, L. (2011). Parthenolide induces apoptosis and cell cycle arrest of Human 5637 Bladder Cancer Cell *in vitro*. *Molecules*. 16. 6758-6768.
18. Cinege, g., Louis, S. Hansch, R., Schnitler, J.P. (2009). Regulation of isoprene synthase promoter by environmental and internal factors. *Plant Molecular Biology*. 69:593-604.
19. Cinkilic, N., Cetintas, S.K., Zorluc, T., Vaan, O., Yilmaz, D., Cavas, T., Tunc, S., Ozkan, L., Bilaloglu, R. (2013). Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, onX-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*. 53. 359-363.
20. Czyz, M., Lesiak-Mieczkowska, K., Koprowska, K., Szulawka-Mroczek, A., Wozniak, M. (2010). Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. *British Journal of Pharmacology*. 160. 1144-1157.
21. D'Anneo, A., Carlisi, D., Lauricella, M., Puleio, R., Bella, S., Marco, P., Emanuele, S., Di fiore, R., Guercio, A., Vento, R., Tesoiriere, G. (2013). Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cell. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. *Cell Death and Disease*. 4:1-14.

22. Dakah, A., Zaid, S., Suleiman, M., Abbs, S., Wink, M. (2014). *In vitro* propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. *Saudi journal of Biological Sciences*. 21. 317-323.
23. Díaz, P., Chul, S., Lee, S., Khoo, C., Rao, S. (2012). Selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medical*. 7 (26). 1-9.
24. Díaz-Rubio, E., García-Conde, J. (2000). *Oncología clínica Básica*. Aran Ediciones. España.
25. Dieter, R. (1991). *Plant tissue culture techniques*. Mam. INst. Oswaldo Cruz. 86. 21-24.
26. Dong, C.J., Wang, X.L., Shang, Q.M. (2011). Salicylic acid regulates sugar metabolism that confers tolerance to salinity stress in cucumber seedlings. *Scientia Horticulturae*. 4(27): 629-636.
27. Dupuy, O.A., Murillo, R., Bonilla, J.A. (2008). Lactonas sesquiterpénicas de las plantas *Viguiera Sylvatica* y *Decachaeta thieleana* (Asteraceae) modulan la producción de óxido nítrico y la fagocitosis de macrófagos RAW. *Revista Biológica Tropical*. 56(3):1063-1073.
28. El-Shamy, A. El-Hawary, S., Rateb, M. (2007). Quantitative estimation of parthenolide in *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. Cultivated in Egypt. *Journal of AOAC International*. 90:21-27.
29. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *In. J. cancer*. 127(12)
30. Fishedick, J., Standiford, M., Johnson, D., De Vos, R., Todorovic, S., Verporte, T., Johnson, J. (2012). Activation of antioxidant response element in mouse primary cortical cultures with sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum parthenium*. *Plant Med*. 78(16)1725-1730.
31. Fraisse, D., Felgines, C., Texier, O., Jean-Louis. (2011). Compounds of some wild herbs of the Asteraceae family. *Food and Nutrition Sciences*. 2:181-192.

32. Ghantou, A., Sinjab, A., Herceg, Z., Darwiche, N. (2013). Parthenolide: from plant shoots to cancer roots. *Drug Discovery Today*. 18(17):894-905.
33. González, B. (2007). *Tratado de medicina y tratamiento de soporte del paciente con cáncer*. 2ª ed. Panamericana. Buenos Aires. Madrid.
34. González, M. T. de Mendoza A. J.H., Cabrera, R.P. (2001). Daño múltiple de órganos: Morfología de la respuesta inflamatoria sistémica. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 30:77-88.
35. Gopinath, B., Gandhi, K., Saravanan, S. (2014). *In vitro* propagation of an important medicinal plant *Artemisia annua* L. from axillary bud explant. *Advanced in Applied Science Research*. 5:254-258.
36. Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drugs resistance. *Annual Review of Medicine*. 53:615-627.
37. Hailu, T., Abera, B., Gabra, E. (2013). *In vitro* mass propagation of *Artemisia (Artemisia annua* L.) cv: Anamed. *Plant Tissue Culture. & Biotechnology*. 23(2):165-176.
38. Hee, I., Wook, S., Hun, S., Ok, S., Teik, S., Dae-Ghon, Mi-Jin, Hyun, W. (2012). Parthenolide-induced apoptosis of hepatic stellate cell and anti-fibrotic effects in *in vivo* rat model. *Experimental and Molecular Medicina*. 44(7):448-456.
39. Hemalswarya, S., Doble, M. (2006). Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. *Phytotherapy Res*. 20(4):239-249.
40. Hendricks, H., Anderson, Y., Engels, G., Bos, R., Woerdenbag, H. (1997). The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. *Planta Medica*. 63: 356-359.
41. Heptistall, S., Awang, D.V.C., Dawson, B.A., Kindack, D., Knight, D.W., May, J. (1992). Parthenolide content and bioactivity of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) estimation of commercial and authenticated feverfew products. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 44:391.

42. Htay, A., Min, S., Jeung-Sul, Hyung, S., Byung, K., Kil, C. (2014). Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum*. *Comptes Rendus Biologies*. 337:383-390.
43. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2014). Estadística a Propósito de Día Mundial Contra el Cáncer (4 de Febrero). Consulta en línea el 19 de diciembre de 2014. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2014/cancer17.pdf>
44. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Consulta en línea el 20 de Diciembre de 2014. Disponible en <http://globocan.iarc.fr/ia/World/atlas.html>
45. Karimian, H., Mohad, s., Zorofchian, S., Fabdaeinassab, M., Razavi, M., Arya, A., Kamalidehghan, B., Ali, H., Nordin, M. (2014). *Tanacetum polycephalum* (L.) Schultz-Bip. Induces Mitochondrial-Mediated Apoptosis and inhibition migration and invasion in MCF7 cell. *Molecules*. 19. 9478-9501.
46. Kelley, M. R. (2012). *DNA Repair in cancer Therapy*. Academic Press. Elsevier. USA. 309 pp.
47. Keskitalo, M., Kanerva, T., Pehu, E. (1995). Development of *in vitro* procedures for regeneration of petiole and leaf explants and production of protoplast-derived callus in *Tanacetum vulgare* L. (Tansy). *Plant Cell Reports*. 14:261-166.
48. Kisiel, W., Stojakowska, A. (1997). Asesquiterpene coumarin ether from transformed root of *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*. 46(3):515-516.
49. Knaul, F.M., Arreola-Ornelas, H., Velázquez, E., Dorantes, J., Méndez, O., Ávila-Burgos. (2009) El costo de la atención médica de cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública de México*. 51 (2).286-295.
50. Knight, D.W. (1995). Feverfew: Chemistry and Biological Activity. *Natural Product Reports*.

51. Korkina, L., Kostyuk, V. (2012). Biotechnologically produced secondary plant metabolites for cancer treatment and prevention. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13:265-275.
52. Kuć, J., Ullstrup, A.J., Quackenbush, F.W. (1955). Production of fungistatic substances by plant tissue after inoculation. *Science* 1955
53. Kuenzig, W., Chau, J., Norkus, E., Holowaschenko, H., Newmark, H., Mergens, W., Conney, A. H. (1984). Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis*. 5(3):309–313.
54. Lai-King, S., Brown, D. (1999). Coniferaldehyde derivatives from tissues culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*.50:781-785.
55. Lanore, D., Delprat, S. (2004). *Quimioterapia Anticancerosa*. Masson. Barcelona España.
56. Leon, J., Rojo, E., Sánchez-Serrano, J.J. (2001). Wound signaling in plants. *J. Exp. Bot.* 52:1-9.
57. Lim, T.K. (2014). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Vol. 7. Springer. New York.
58. Macdonald, F., Ford. C.H.J., Casson, A.G. (2004). *Molecular Biology of cancer*. 2a ed. Garland Science/BIOS Scientific Publishers. New York.
59. Majdi, M., Charnikhova, T., Bouwmeester, H. (2013). Genetical, developmental and spatial factors influencing parthenolide and its precursor custunolide in feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Industrial Crops and Products*. 47:270-276.
60. Makheja, A. N., Baley, J.M. (1982). A platelet phospholipase inhibitor from the medicinal herb (*Tanacetum parthenium*). *Prostagland leukotriens and Medicine*. 8(6). 653-660.
61. Mendoza, N. (2008) *Farmacología Médica. Medica Panamericana*. UNAM. México.
62. Meneses-García, A., Ruíz-Godoy, L.M., Beltrán-Ortega, A., Sánchez-Cervantes, F., Tapia-Conyer, R., Mohar, A. (2012). Principales neoplasias malignas en México y su distribución geográfica (1992-2002). *Revista de Investigación Clínica*. 64(4):322-329.

63. Mohajjel, A., Bagher, M., Khosrowshahli, M., Movafeghi, A. (2010). Callogenesis capability and calli somaclonal variation of costmary (*Tanacetum balsamita* L.). *Romanian Biotechnological Letters*. 15(2):5120-5125.
64. Nathar, V.N., Yattoo, G.M. (2013). Micropropagation of an antidiabetic medicinal plant, *Artemisia pallens*. *Turkish Journal of Botany*. 38:491-498.
65. Niggeweg, R., Michael, A., Martin, C. (2004). Engineering plants with increased level of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature*. 22(6):746-754.
66. Oksman-Caldentey, K.M., Inze, D. (2004). Plant cell factories in the postgenomic era: new way to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*. 9:944-440.
67. Olivera-Ortega, V., Gutiérrez-Espinoza, M.A., Gutiérrez-Espinoza, J.A., Andrade-Rodríguez, M. (2000). Cultivo *in vitro* de Gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus) y su aclimatación en invernadero. *Bioagro*. 12(3):75-80.
68. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). Cáncer. Nota descriptiva N° 279. Consultado en línea el 20 de Diciembre de 2014. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
69. Pająk, B., Orzechowski, A., Gajkowska, B. (2008). Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cell. *Folia Histochemica et.Cytobiologica*. 46(2):129-135.
70. Pareek, A. Suthar, M., Rathore, G.S. Bansal, V. (2011). Feverfew (*Tanacetum parthenium*): a systematic review. *Pharmacology Rev*. 5:103-110.
71. Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer*. Oxford. United Kingdom. 299pp.
72. Pei, S., Jordan, C., Wehrheim, M. (2012). How close are we to targeting the leukemia stem cell? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 25: 415-418.
73. Perumal, S., Mahmud, R. y Ramanathan, S. (2015). Anti-infective of caffeic acid and epicatechin 3-gallete isolated from methanol extract of *Euphorbia hirta* (L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Natural Product Research*. 9: 1-4.
74. Pham-Huy, L. He, H. y Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, Antioxidants in disease and healt. *International of Biomedical Science*. 4(2).89-96.

75. Rangel, G., Castro, E., Beltran, E., Reyes, H., García, E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*. 12(2):90-95.
76. Rateb, M. E., El-Hawary, S.S., El -Shamy, A.M., Yousef, E.M. (2007). Production of parthenolide in organ and callus cultures of *Tanacetum parthenium* (L.). *African Journal of Biotechnology*. 6(11):1306-1316.
77. Rodack, F. B. (2004). *Hematología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. 2ª ed. Medica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
78. Rodríguez, H., Hecheverría, I., Rodríguez, C.A., Rivera, Ma. M. (2003). Propagación *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. en cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
79. Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski, y col. (2005). *Flora fanerógama del Valle de México*. 2ª ed. Instituto de Ecología, A.C. y comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Patzcuaro (Michoacán).
80. Sánchez, M.C., Salaverría, J.L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.) *Revista UDO*. 4(1):21-26.
81. Secretaria de Salud [SSA] Subsecretaria de Prevención y Promoción de Salud [SPPS]. (2013). Los 5 tipos que más afectan a mexicanos. Consultado en línea el 19 de Diciembre de 2014. Disponible en <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
82. Silvia, T., Oliveira, C., Borgues, F. (2014). Caffeic acid derivatives, analogs and applications: a patent review (2009-2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 24(11):1257-1270.
83. Sonboli, A., Oberprieler, C. (2012). On sights into the phylogenetic and taxonomic position of *Tanacetum semenovii* Herder (Compositae, Anthemideae) based on nrDNA ITS sequences data. *Biochemical Systematics and Ecology*. 45: 166-170.
84. Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J., Xu Z., Finley, J. (2012). Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *J. Agric. Food Chem.* 60:6658-6577.

85. Steward, W.B., Kleihues, P. (2003). World cancer Report. Lyon ICAR Press. Disponible en (<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/WorldCancerReport.pdf>).
86. Stojakowska, A. and Kiesel, W. (1997). Production of parthenolide in organ cultures of feverfew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 47:159-162.
87. Sun, Y., Daret, K., Clair, S. Fang, F., Warren, G., Rangnekar, V., Crooks, P., Clair, W. (2007). The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor- $\kappa$ B inhibition and enhanced by the presence of PTEN. *Mol. Cancer Ther.* 6(9).2477-2487.
88. Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U.S.R., Jörg-Peter (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*. 45(4):540-560.
89. Tibes, R., Trent, J., Kurzrock, R. (2005). Tyrosine kinase inhibitors and the dawn of molecular cancer therapeutics. *Annual Review pharmacology Toxicology*. 45:357-384.
90. Torres-Contreras, A.M., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. (2014). Plants as biofactories: Stress-induced production of chlorogenic acid isomers in potato tubers as affected by wounding intensity and storage time. *Industrial crops and Products*. 62:61-66.
91. USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN) (Online Database) (2014). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Consulta en línea el 25 septiembre de 2014. Disponible en [http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax\\_search.pl?Tanacetum%20parthenium](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl?Tanacetum%20parthenium) (28 Noviembre 2014)
92. Vermeris, W., Nicholson, R. (2006). Phenolic compound biochemistry. *Springer. Dordrecht*.
93. Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Review*. 1:13-25.
94. Vidyasagar, K. (2006). *National Conference on Plant Biotechnology*, Lady Doak College, Madurai.

95. Wambugu, F., Rangan, T.S. (1981). *In vitro* clonal multiplication of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* vis.) by micropropagation. *Plant Science Letters*.22:219-226.
96. Wang, W., Guo, J., Zhang, J., Peng, J., Liu, T., Xin, Z. (2014). Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. *Food Chemistry*. 171. 40-49.
97. Waterhouse, N.J., Sutton, V.R. Sedelies, K.A. Ciccone, A., Jenkins, M., Turner, S., Bird, P., Trapani, J. (2006). Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *JCB*. 173(1):133-144.
98. William, C.A., Harborne, J.B., Geiger, H., Hoult, J.R. (1999). The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*. 51. 417-423.
99. Wojciechowska, E., Weinert, C.H., Egert, B., Trierweiler, B., Schmidt-Heydt, M., Horneburg, B., Graeff, S., Kulling, S., Geisen, K. (2014). Chlorogenic acid, a metabolite identified by untargeted metabolome analysis in resistant tomatoes, inhibits the colonization by *Alternaria alternata* by inhibiting alternation biosynthesis. *European Journal Plant Pathology*. 139:735-747.
100. Woods, J., Mo, H., Bieberich, A., Alavanja, T., Colby, D.A. (2013) Amino-derivatives of the sesquiterpene lactone class of natural products as prodrugs. *Medical Chemical Commun*. 4:27-33.
101. Wu, C., Chen, F., Wang, X., Hyun-Jin, Guo-qing, H. Haley-Zitlin, V., Huang, G. (2006). Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chemistry*. 96:220-227.
102. Wyrębska, A., Szymański, J., Gach, K., Piekielna, J., Koszuk, J., Janecki, T., Janecka, A. (2013). Apoptosis-mediated cytotoxic effects of parthenolide and the new synthetic analog MZ-6 on two breast cancer cell lines. *Molecular Biology Reproduction*. 40.1655-1663.

103. Yen-kim, W. Choon-Nam, Shi, X., Han-Ming. (2004). Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis*. 25(8):1449-1458.
104. Zhang, S., Choon-Nam., Han-Ming. (2004). Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Cancer Letters*. 211:175-188.
105. ZiQi, Z. J, Kou, X., Stevenson D. (1999). Rapid extraction and High-Performance liquid chromatographic determination of parthenolide in Feverfew (*Tanacetum parthenium*). *J. Agric. Food Chem*. 47:1018-1022.
106. Zitta, K., Meybohm, P., Bein, B., Huang, Y., Heinrich, C., Scholz, J., Steinfath, M., Albrecht, M. (2012). Salicylic acid induced apoptosis in colon carcinoma cells grown *in-vitro*: influence of oxygen and salicylic acid concentration. *Experimental Cell Research*. 318(7):828-834.

## XI. ANEXOS

### Anexo 1. Medio de Cultivo

#### 1. Soluciones stock del medio MS.

1.1 Los componentes del medio de cultivo MS al 100% en soluciones Stock concentradas (X) son como se muestran:

<b>Macronutrientes</b>		
Componente	1X (mg/L)	10X en mg (g)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	1650	16500 (16.5)
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	332.2	3322 (3.322)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	3700 (3.7)
KNO <sub>3</sub>	1900	19000 (19)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1700 (1.7)
<b>Vol. Aforo</b>		1000 ml
<b>Fe-EDTA</b>		
Componente	1X (mg/L)	20X en mg (g)
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	556 (0.556)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	746 (0.746)
<b>Vol. Aforo</b>		100ml
<b>Micronutrientes</b>		
Componente	1X (mg/L)	100X en mg (g)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	620 (0.62)
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5 (0.0025)
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5 (0.0025)
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.9	1690 (1.69)
KI	0.83	83 (0.083)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	25 (0.025)
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	860 (0.860)
<b>Vol. Aforo</b>		100 ml
<b>Orgánicos</b>		
Componente	1X (mg/L)	100X en mg (g)
Mio-inositol	100	10000 (10)
Glicina	2.0	200 (0.2)
Ácido nicotínico	0.5	50 (0.05)
Piridoxina HCl	0.5	50 (0.05)
Tiamina HCl	0.1	10 (0.01)
<b>Vol. Aforo</b>		100 ml

1.2 Se prepararon soluciones stock concentradas (0.5 mg/L) de KIN y (0.05mg/L) ANA.

1.3 La solución Stock de antioxidantes (100ml/20X) se preparó con 1.5g de ácido ascórbico y 1g de ácido cítrico; disolviendo en agua y aforando a 50ml.

## 2. Medio basal

2.1 Se preparó el medio de cultivo al 50%, a partir de los Stock preparados y con los volúmenes indicados en seguida:

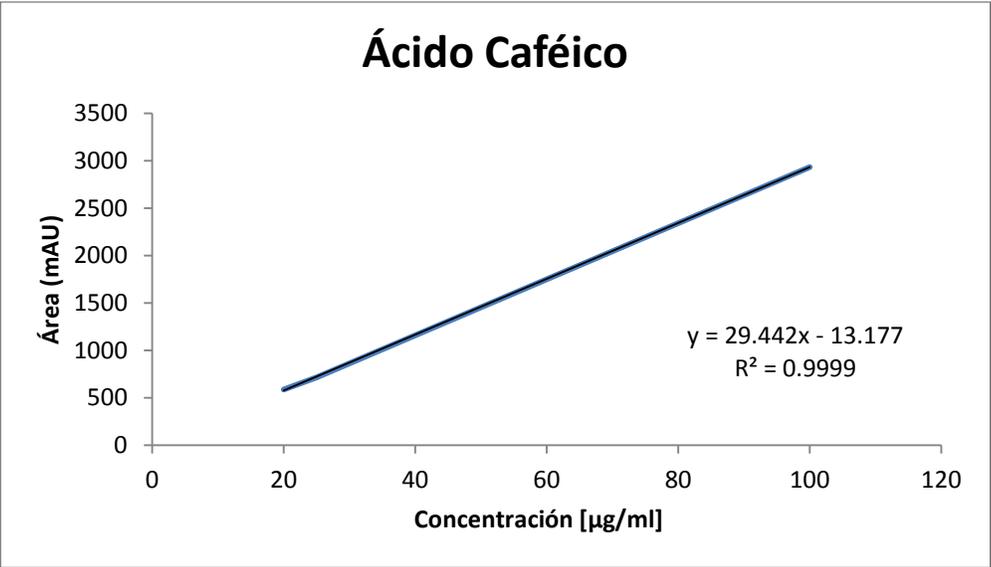
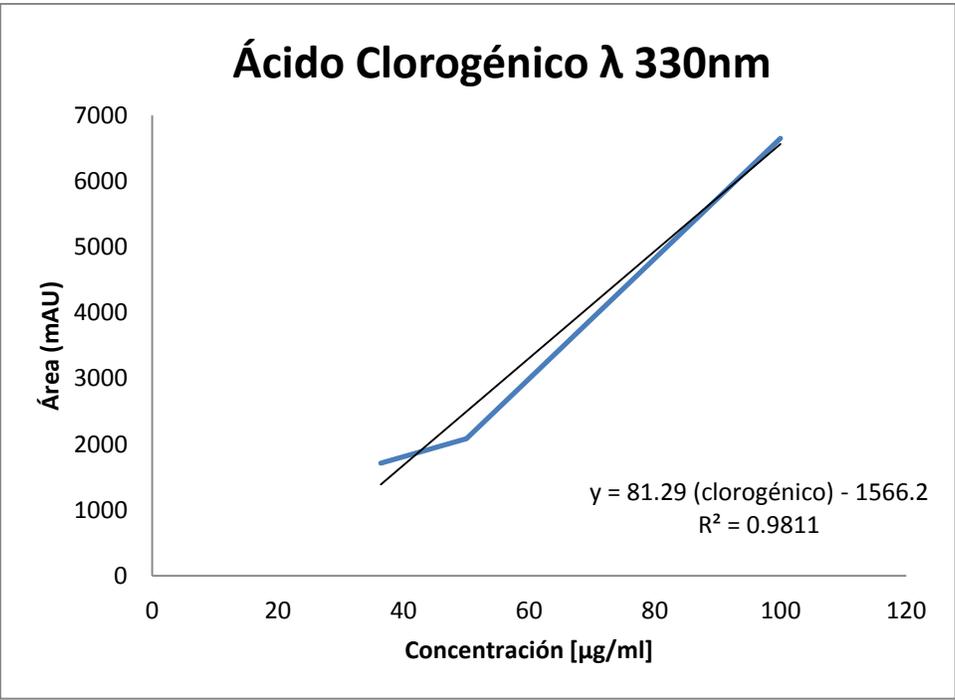
Stock	Volumen requerido del Stock para 1L de medio al 100%	Volumen requerido del Stock para 1L de medio al 50%
Macronutrientes	1000ml/10X	50ml/L
Micronutrientes	100ml/100X	0.5ml/L
Vitaminas	100ml/100X	0.5ml/L
Fe-EDTA	100ml/20X	2.5ml/L
Sacarosa		30g/L
Antioxidantes	100ml/20X	

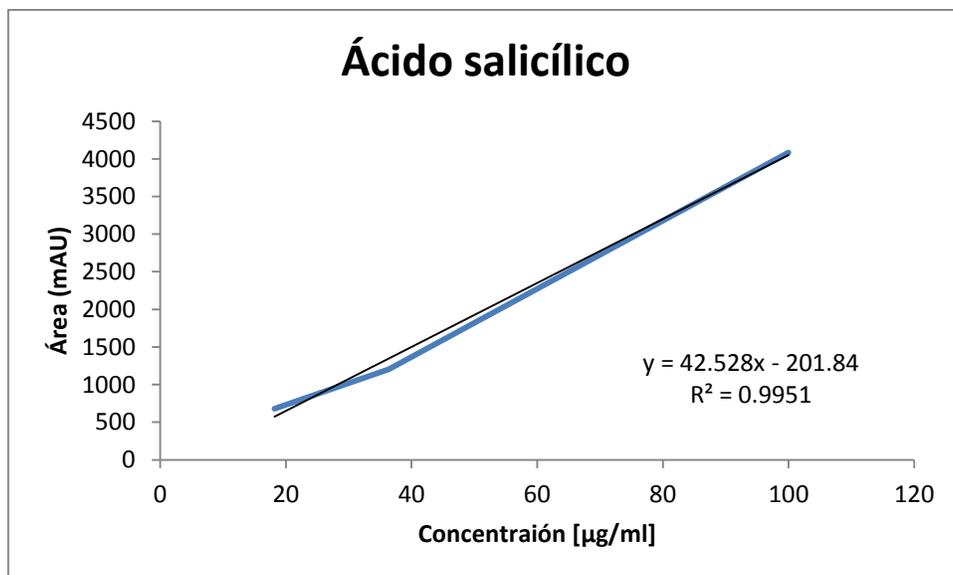
2.2 El ajuste de pH del medio se realizó al 5.7-5.8 con soluciones de NaOH 1N o HCL 1N

2.3 El adiciónó 2 g/L de phytigel para el medio de cultivo y poniéndolo a hervir por 1 min.

## Anexo 2. Curvas patrón

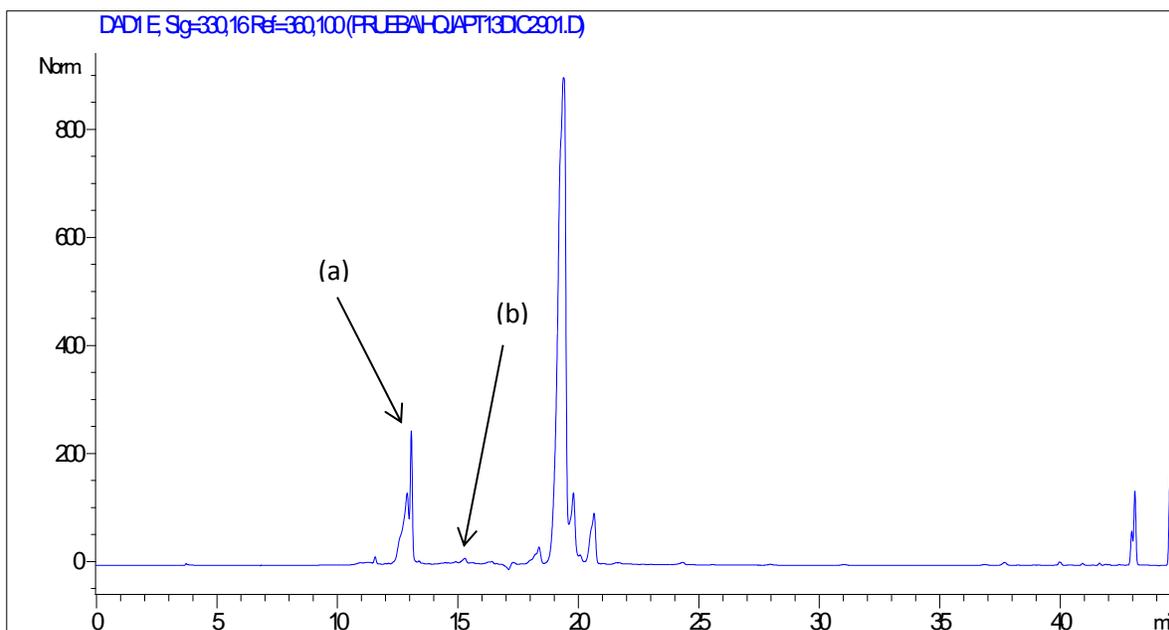
Se preparó una solución Stock (200 mg/L) para generar concentraciones finales y crear la curva patrón de cada estándar. Para el ácido clorogénico (100, 50 y 36.36 mg/L a una  $\lambda$  330 nm). El ácido salicílico (18.18, 36.36 y 100 mg/L a una  $\lambda$  245 nm) y el ácido cafeico (20, 25 y 100 mg/L a una  $\lambda$  330 nm). Las diluciones preparadas se analizaron en el equipo de HPLC y se obtuvieron los siguientes gráficos.





### Anexo 3. Cromatogramas

Cromatograma de extracto de hoja derivada de plántula de *T. parthenium* tratada con RCV en el que se detecta el mayor contenido de ácido clorogénico (a) y ácido caféico (b) al día 21 de incubación.



Cromatograma de extracto de hoja derivada de plántula de *T. parthenium* tratada con RCV en la que se detecta el mayor contenido de ácido salicílico (a) correspondiente al día 30 de incubación.

