



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CULTIVOS *IN VITRO* DE
ESPECIES PRODUCTORAS DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS Y
COMPUESTOS FENÓLICOS EN UNA LÍNEA CELULAR DE LINFOMA

TESIS

Para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

PRESENTA

M en BE. Aurelio Nieto Trujillo

Comité tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Codirectora: Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Asesor: Dr. Rosendo Luria Pérez

CDMX, México, enero del 2020

El Programa de Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001466, en el Nivel de Competencia Internacional, y cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Durante el transcurso del Doctorado en Biotecnología (periodo 2015-2019), en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario 300569.

Ciudad de México a 31 de enero del 2020

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“ Evaluación de la actividad citotóxica de cultivos *in vitro* de especies productoras de lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos en una línea celular de linfoma”

Que presentó

M en B.E. Aurelio Nieto Trujillo

Comité Tutorial:

Director de tesis: Dr. Francisco Cruz Sosa, UAM-Iztapalapa

Codirector: Dra. María Elena Estrada Zúñiga, Facultad de Ciencias UAEMex

Asesor: Dr. Rosendo Luria Pérez, Unidad de Investigación en Enfermedades
Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez

Jurado:

Presidente: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Secretario: Dra. Angélica Román Guerrero

Vocal: Dr. Rosendo Luria Pérez

Vocal: Dr. Antonio Bernabé Antonio



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00221
Matrícula: 2153806086

Evaluación de la actividad
citotóxica de cultivos in
vitro de especies
productoras de leptonas
resquiterpénicas y
compuestos fenólicos en una
línea celular de linfoma

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas
del día 31 del mes de enero del año 2020 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA
DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO
DR. ROSENDO LURIA PEREZ
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretaría la última, se reunieron a la presentación de la
Disertación Pública cuya denominación aparece al margen,
para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: AURELIO NIETO TRUJILLO

y de acuerdo con el artículo 79 fracción IV del Reglamento
de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma
Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó el
interésado el resultado de la evaluación y, en caso
aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL

DR. ANTONIO BERNABE ANTONIO

VOCAL

DR. ROSENDO LURIA PEREZ

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por darme momentos inolvidables y aprendizaje invaluable en toda mi formación y al Posgrado en Biotecnología por darme la oportunidad de pertenecer a su selecto grupo de estudiantes.

A mi comité tutorial por su apoyo y atención prestada para mi formación académica, ya que ellos hicieron posible la culminación de este proyecto tan importante para mí.

A mis compañeros del laboratorio en la UAM-I, en la UIEO y en el CIRB por hacer del espacio de trabajo un entorno cordial y muy productivo.

A MI FAMILIA POR CREER EN MÍ Y APOYARME EN LO POSIBLE EN TODO MOMENTO, POR SER MI MOTIVACIÓN.

RESUMEN

Los linfomas son neoplasias hematopoyéticas, que se encuentran entre las principales causas de muerte en el mundo, y aunque el tratamiento con agentes quimioterapéuticos es alentador, el desarrollo de resistencia a los tratamientos impide la eliminación completa de las células transformadas y hace necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, como los compuestos fenólicos y lactonas sesquiterpénicas producidas por las plantas.

En el presente trabajo se logró establecer un cultivo aséptico de semillas de *Arnica montana*, el cual fue empleado como fuente de explantes foliares para la inducción de callos. La combinación de reguladores del crecimiento vegetal que dio mejores respuestas morfogénicas fue de 1 mg/L de picloram y 0.5 mg/L de cinetina. Los callos obtenidos se usaron para establecer un cultivo de células en suspensión de *A. montana*, que fue caracterizada cinética y fitoquímicamente, determinando que son estables, disgregables, de rápido crecimiento y con capacidad de producción de metabolitos secundarios.

Los cultivos de células en suspensión de *A. montana* y de *B. cordata*, y el cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium* fueron utilizados para realizar extractos metanólicos y sus fracciones conteniendo metabolitos secundarios del tipo fenólico y terpénico con diferencias en la polaridad debido a los disolventes empleados con polaridad ascendente por medio de cromatografía en columna. Se realizó un análisis fitoquímico cualitativo y cuantitativo para obtener fracciones estandarizarlas y determinar su actividad citotóxica. Todas las fracciones probadas presentaron actividad citotóxica por medio de la prueba de azul de tripán, siendo las máximas concentraciones (20, 30 y 40 µg/mL) las que disminuyen en mayor medida la viabilidad celular de las células de linfoma (entre 80-14 % de viabilidad celular), la coadministración de las fracciones con el agente quimioterapéutico Vincristina, demostró que estas fracciones también tienen la capacidad de sensibilizar a la quimioterapia a las células de linfoma.

ABSTRACT

Lymphomas are hematopoietic neoplasms, which are among the leading causes of death in the world, and although treatment with chemotherapeutic agents is encouraging, the development of resistance to treatments prevents the complete elimination of transformed cells and makes it necessary to develop new alternatives. therapeutic, such as phenolic compounds and sesquiterpenic lactones produced by plants.

In the present work it was possible to establish an aseptic culture of *Arnica montana* seeds, which was used as a source of leaf explants for the induction of calluses. The combination of plant growth regulators that gave better morphogenetic responses was 1 mg/L of picloram and 0.5 mg / L of kinetin. The corns obtained were used to establish a suspension cell culture of *A. montana*, which was characterized kinetically and phytochemically, determining that they are stable, disintegrable, fast growing and capable of producing secondary metabolites.

The cultures of cells of suspension of *A. montana* and *B. cordata*, and the culture of roots in suspension of *T. parthenium* were used to realize methanolic extracts and their fractions containing secondary metabolites of the phenolic and terpene type with differences in the polarity due to solvents used with ascending polarity by means of column chromatography. A qualitative and quantitative phytochemical analysis was performed to obtain standardized fractions and determine their cytotoxic activity. All the fractions tested had cytotoxic activity by means of the trypan blue test, with the highest concentrations (20, 30 and 40 µg/mL) which most significantly decrease the cell viability of lymphoma cells (between 80-14 % cell viability), the co-administration of the fractions with the chemotherapeutic agent Vincristine, showed that these fractions also have the ability to sensitize chemotherapy to lymphoma cells.

ABREVIATURAS

AA	Actividad antioxidante	GC-MS	Cromatografía de gases-acoplado a masas
AIA	Ácido indolacético	GFPT	Glucósidos fenilpropanoides totales
AIB	Ácido indolbutírico	HLN	Helenalina
ANA	Ácido α -naftalenacético	HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
ANOVA	Análisis de varianza	Kin	Cinética
ATCC	American type culture collection	LNH	Linfoma no-Hodgkin
BAP	Bencilaminopurina	LS	Lactonas sesquiterpénicas
CCSAm	Cultivo de células en suspensión de <i>Arnica montana</i>	μ	Velocidad específica de crecimiento
CCSBc	Cultivo de células en suspensión de <i>Buddleja cordata</i>	MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
CF	Compuestos fenólicos	MS	Murashige y Skoog
CRSTp	Cultivo de raíces en suspensión de <i>Tanacetum parthenium</i>	NFAT	Factor nuclear de las células T activadas
EAG	Equivalentes de ácido gálico	NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
EMR	Enfermedad mínima residual	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EP	Equivalentes de partenólida	Pic	Picloram
EQ	Equivalentes de quercetina	PTN	Partenólida
EV	Equivalentes de verbascósido	RCV	Regulador del crecimiento vegetal
FvT	Flavonoides totales	VB	Verbascósido
GA ₃	Ácido giberélico	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades del cáncer	3
2.1.1 El cáncer como problema de salud pública	5
2.2 Compuestos bioactivos derivados de plantas contra el cáncer	8
2.2.1 Actividades biológicas de la partenólida	10
2.2.2 Actividades biológicas de la helenalina	12
2.2.3 Actividades biológicas del verbascósido	13
2.3 Especies de plantas productoras de lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos	14
2.3.1 <i>Arnica montana</i>	14
2.3.1.1 Descripción botánica	14
2.3.1.2 Importancia medicinal y farmacológica	15
2.3.1.3 Constituyentes químicos	15
2.3.2 <i>Tanacetum parthenium</i>	17
2.3.2.1 Descripción botánica	17
2.3.2.2 Importancia medicinal y farmacológica	18
2.3.2.3 Constituyentes químicos	18
2.3.3 <i>Buddleja cordata</i>	19
2.3.3.1 Descripción botánica	19

2.3.3.2 Importancia medicinal y farmacológica	20
2.3.3.3 Constituyentes químicos	20
2.4 Cultivo de tejidos vegetales para la obtención de compuestos bioactivos	21
2.4.1 Cultivo de tejidos vegetales en <i>A. montana</i> , <i>T. parthenium</i> y <i>B. cordata</i>	21
2.5 Bioensayos de citotoxicidad con líneas celulares de cáncer	22
3 JUSTIFICACIÓN	24
4 HIPÓTESIS	24
5 OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
6 MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Cultivo <i>in vitro</i> de especies vegetales	26
6.1.1 Cultivo de células en suspensión de <i>Arnica montana</i>	26
6.1.1.1 Material vegetal	26
6.1.1.2 Establecimiento del cultivo aséptico	26
6.1.1.3 Medio de cultivo y condiciones de incubación	26
6.1.1.4 Establecimiento de cultivos de células en suspensión de <i>Arnica montana</i>	27
6.1.1.5 Cinética de crecimiento del CCSAm	28
6.1.1.6 Caracterización fitoquímica del CCSAm	28
6.1.1.7 Proliferación de biomasa por medio de subcultivos	30

6.1.2 Cultivo de raíces en suspensión de <i>Tanacetum parthenium</i> (CRSTp)	30
6.1.3 Cultivo de células en suspensión de <i>Buddleja cordata</i> (CCSBc)	31
6.2 Extracción metanólica de la biomasa proliferada de los cultivos <i>in vitro</i>	32
6.2.1. Fraccionamiento de los extractos	32
6.2.2 Análisis fitoquímico cualitativo	33
6.2.3 Análisis fitoquímico cuantitativo	33
6.2.4 Actividad antioxidante (AA)	33
6.2.5 Barrido espectrofotométrico de las fracciones	34
6.3 Actividad biológica de las fracciones	34
6.3.1 Cultivo de la línea celular de Linfoma de Burkitt	34
6.3.2 Viabilidad celular por medio de la tinción de Azul de tripán	34
6.4 Análisis estadístico	35
7 RESULTADOS	36
7.1 Establecimiento del CCSAm	36
7.1.1 Asepsia de semillas, germinación y barrido hormonal	36
7.1.2 Caracterización de los parámetros cinéticos de crecimiento del CCSAm	38
7.1.3 Perfil fitoquímico en el tiempo	39
7.2 Perfil fitoquímico de las fracciones de los cultivos <i>in vitro</i>	41
7.2.1 Análisis fitoquímico cualitativo	41
7.2.2 Análisis fitoquímico cuantitativo	42

7.2.3 Barrido espectrofotométrico	43
7.3 Actividad citotóxica de las fracciones	45
7.3.1 Concentración inhibitoria media (IC ₅₀)	50
8 DISCUSIÓN	52
9 CONCLUSIONES	59
10 PERSPECTIVAS	60
11 BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXO: PUBLICACIÓN DE ARTÍCULO CIENTIFICO	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadísticas del cáncer en el mundo	7
Figura 2. Incidencia del cáncer en México entre el periodo de 1980 a 2011	8
Figura 3. Estructura química de la partenólida	10
Figura 4. Mecanismos moleculares que median la inducción de apoptosis por medio de la PTN	11
Figura 5. Estructura química de la helenalina	13
Figura 6. Estructura química del verbascósido	14
Figura 7. Descripción morfológica de <i>A. montana</i>	15
Figura 8. Descripción morfológica de <i>T. parthenium</i>	18
Figura 9. Descripción morfológica de <i>B. cordata</i>	20
Figura 10. Línea celular proliferada para la realización de extractos	30
Figura 11. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>T. parthenium</i> : a) CRSTp y b) biomasa de raíces para la extracción	31
Figura 12. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. cordata</i> : a) CCSBc y b) células proliferadas para la obtención del extracto	32
Figura 13. Columna empleada para el fraccionamiento de los extractos metanólicos de los tres cultivos <i>in vitro</i>	33
Figura 14. Plántula de <i>A. montana</i> cultivada <i>in vitro</i>	36
Figura 15. Características fenotípicas de callos de <i>A. montana</i> cultivados en suspensión a 15 días	38

Figura 16. Caracterización del crecimiento celular del CCSAm y consumo de la fuente de carbono durante 30 días	39
Figura 17. Análisis fitoquímico sobre los metabolitos secundarios contenidos en el extracto metanólico obtenido de la línea celular P ₁ K _{0.5}	40
Figura 18. Análisis fitoquímico cualitativo de fracciones	41
Figura 19. Espectros de absorción de las fracciones 4 (azul), 5 (rojo) y 8 (verde) del CCSAm	43
Figura 20. Espectros de absorción de las fracciones 4 (azul), 5 (rojo) y 8 (verde) del CRSTp	44
Figura 21. Espectros de absorción para las fracciones 3 (azul), 4 (rojo) y 5 (verde) del CCSBc	44
Figura 22. Efecto de la vincristina y del DMSO a diferentes concentraciones sobre la línea celular ramos	46
Figura 23. Fracciones del CCSAm a 24 horas de tratamiento	47
Figura 24. Fracciones del CRSTp a 24 horas	49
Figura 25. Fracciones del CCSBc a 24 horas	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad citotóxica de la partenólida en líneas celulares de cáncer	11
Tabla 2. Porcentaje de respuesta morfogénica inducida en explantes foliares de <i>A. montana</i> a tratamientos con reguladores del crecimiento vegetal	37
Tabla 3. Análisis cualitativo de compuestos fenólicos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas por ensayos colorimétricos de las fracciones de los 3 cultivos en suspensión	41
Tabla 4. Análisis fitoquímico cuantitativo de CFT, FvT, GFPT y LST y AA de fracciones obtenidas de los cultivos en suspensión de las 3 especies vegetales	42
Tabla 5. Concentración requerida de las fracciones a 24 horas, obtenidas de cultivos <i>in vitro</i> , solas o combinadas con vincristina adicionada a 6 horas previas al conteo celular para inhibir al 50% la viabilidad celular de la línea RA-1	50

1 INTRODUCCIÓN.

El cáncer, es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda causa de muerte en países en desarrollo, este padecimiento se encuentra en aumento como resultado del crecimiento y el envejecimiento poblacional, así como de un incremento en la adopción de estilos de vida que incluyen fumar, el sedentarismo, y una mala dieta alimentaria (Jemal *et al.*, 2011; Torre *et al.*, 2016). El cáncer se define como un crecimiento anormal de las células debido a su división celular y apoptosis descontrolada; estas células “malignas” pueden invadir otros tejidos en distintas partes del cuerpo. El cáncer no es una sola enfermedad, sino un grupo que está conformado por más de 100 distintos tipos de cáncer (Chavan *et al.*, 2013). Se clasifica en 4 grandes grupos de acuerdo con su origen en: epitelial, mesenquimático, neuroectodérmico y hematopoyético (Weinberg, 2007). En este último grupo, se encuentran los linfomas, un grupo heterogéneo de enfermedades proliferativas malignas del tejido linfóide con origen celular, morfología, citogenética, conducta biológica y respuesta al tratamiento variables, que puede diseminarse a otros tejidos y el pronóstico de supervivencia o curación depende de la variedad histológica, etapa clínica y tratamiento (Morales-Polanco, 2000). Los linfomas se clasifican en linfoma no-Hodgkin (LNH) y Linfoma de Hodgkin (LH), siendo los LNH los más frecuentes que el Linfoma de Hodgkin. El curso clínico de los LNH varía desde tipos rápidamente mortales, hasta otros quiescentes e inicialmente bien tolerados. El linfoma es tratado con quimioterapia citotóxica principalmente (Guillerman *et al.*, 2011); aunque los resultados son alentadores, la aparición frecuente de resistencia a los medicamentos impide la eliminación completa de las células transformadas. Por lo tanto, es esencial desarrollar nuevas alternativas de tratamiento.

La enorme diversidad de naturaleza química, junto con miles de años de la selección biológica, ha generado un vasto y poco explorado reservorio de estructuras químicas únicas con actividad biológica citotóxica de gran importancia (Lucas *et al.*, 2010). Un gran número de agentes anticancerígenos combaten el cáncer a través diferentes mecanismos, como 1) la detención del ciclo celular, 2) inducción de apoptosis y 3) la

diferenciación, así como a través de la 4) inhibición del crecimiento celular y la proliferación, o una combinación de dos o más de estos mecanismos. Dentro de los compuestos que se han reportado ser prometedores agentes contra el cáncer se encuentran los compuestos fenólicos (CF), así como las lactonas sesquiterpénicas (LS) producidos por diferentes plantas, como *A. montana* y *T. parthenium*, pertenecientes a la familia Asteraceae y *B. cordata* perteneciente a la familia Scrophulariaceae (Shiffman, 2011; Abubakar *et al.*, 2012; Orofino *et al.*, 2012; Pourianezhad *et al.*, 2016).

Por lo que la fuerte y creciente demanda en el mercado actual por acceder a compuestos funcionales de origen natural, ha promovido el estudio y uso de cultivos de células vegetales, por tanto, los correspondientes desarrollos biotecnológicos juegan un papel importante en la búsqueda de alternativas en la producción de compuestos bioactivos (Karuppusamy, 2009).

Los modelos de detección de citotoxicidad proporcionan importantes datos preliminares para ayudar a seleccionar extractos o fracciones de plantas con potenciales propiedades antitumorales para futuros estudios (Doudach *et al.*, 2013). El objetivo del presente proyecto fue, evaluar la actividad citotóxica de fracciones de un extracto metanólico obtenido de cultivos *in vitro* de *A. montana*, *T. parthenium* y *B. cordata*, plantas productoras de lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos, sobre una línea celular de Linfoma no Hodgkin.

2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cáncer

El cáncer se caracteriza por un crecimiento fuera de control de las células y la invasión a tejidos (metástasis), resultado de múltiples acumulaciones de mutaciones genéticas que desregulan los procesos de proliferación, diferenciación y sobrevivencia que ocurren en células normales (Schulz, 2007). El cáncer es causado por factores externos, como el fumar tabaco, infecciones por microorganismos y una mala dieta alimentaria, y por factores internos, como son las mutaciones genéticas heredadas, hormonas y condiciones inmunológicas, entre otros (Torre *et al.*, 2016, Bray *et al.*, 2018). Estos factores pueden actuar juntos o en secuencia para dar origen al cáncer. De acuerdo con la American Cancer Society (2015), se requieren aproximadamente 10 años o más entre la exposición a factores externos y la detección del cáncer, y se han asociado seis alteraciones de las células que definen el potencial canceroso, las cuales corresponden a: 1) señales de crecimiento muy activas; 2) evaden la apoptosis; 3) pérdida de la capacidad de respuesta a las señales de anti-crecimiento; 4) liberan sustancias al medio para la vascularización de tejidos; 5) invasión de tejidos y órganos; y 6) crecimiento replicativo ilimitado (Schlaepfer & Mendoza-Espinoza, 2010).

La clasificación inicial del cáncer para su diagnóstico y pronóstico fue basada en la apariencia morfológica, pero esta metodología presentaba serias limitaciones, ya que los tumores con apariencia histopatológica similar podían presentar diferencias significativas en el curso clínico mostrando diferente respuesta a las terapias. Actualmente esta clasificación se basa en el uso de marcadores moleculares específicos (Golub *et al.*, 1999). Las características histopatológicas usadas podían incluir: la integridad del tejido, la morfología celular atípica, el grado histológico, la expresión aberrante de proteínas y marcadores genéticos, la evidencia de transformación maligna, la senescencia y proliferación, las características del margen invasivo y la extensión de la vascularización (Galon *et al.*, 2012).

El cáncer se clasifica en 4 grandes grupos de acuerdo con su origen en: epitelial, mesenquimático, neuroectodérmico y hematopoyético (Weinberg, 2007). Esta última categoría del cáncer puede involucrar casi cualquier componente celular del sistema inmune, pero los más comúnmente diagnosticados son: el mieloma múltiple, la leucemia linfocítica crónica (CLL) de linfocitos B, la leucemia mieloide aguda (AML) y la amplia categoría de LNH (Lucas *et al.*, 2010). Este tipo de tumores se asocian a menudo con mutaciones que bloquean la maduración de la célula progenitora o que anulan su dependencia de los factores de crecimiento (Lagunas-Rangel, 2016). Los linfomas, son el conjunto de enfermedades neoplásicas de los linfocitos que ocurren en las fases extramedulares del desarrollo linfocitario, el origen de los diferentes linfomas dependerá de la estirpe y de la etapa en la que el linfocito inicie su proceso de malignización; son tumores derivados de células madre pluripotentes hematopoyéticas (linaje linfoide) y se caracterizan por aberraciones en los cromosomas, comúnmente tipo translocaciones que provocan la eliminación de la regulación negativa de protooncogenes (genes de células normales implicados en el ciclo celular, proliferación y apoptosis) al fusionarse con la secuencia promotora de otra proteína constitutivamente activa, generando los oncogenes (Sánchez de Toledo & Sábado, 2016; Schulz, 2007). Los linfomas se clasifican en linfoma de Hodgkin (LH) y no Hodgkin (LNH), y se diferencian en que sólo en los primeros están presentes las células Reed-Sternberg, un tipo de células que se caracterizan por ser grandes y anormales que pueden contener más de un núcleo; por otra parte, el linfoma de Burkitt, un tipo de LNH es un linfoma raro predominantemente en adultos, principalmente en hombres, es altamente agresivo y clínicamente distintivo que requiere enfoques de tratamiento únicos (Armitage & Weisenburger, 1998), presenta la translocación t(8;14) que trae como resultado la hiperexpresión constitutiva del factor de transcripción MYC, que es un oncogén que promueve la proliferación de linfocitos B y la producción de linfomas de esta estirpe celular. Además, algunos tipos de linfomas pueden presentar diversas translocaciones que parecen activar las vías de supervivencia relacionadas con el factor nuclear κB (NF- κB), factor pro-apoptótico en células no cancerosas (Schulz, 2007; Avendaño & Menéndez, 2008). Un cuadro sintomático similar a la

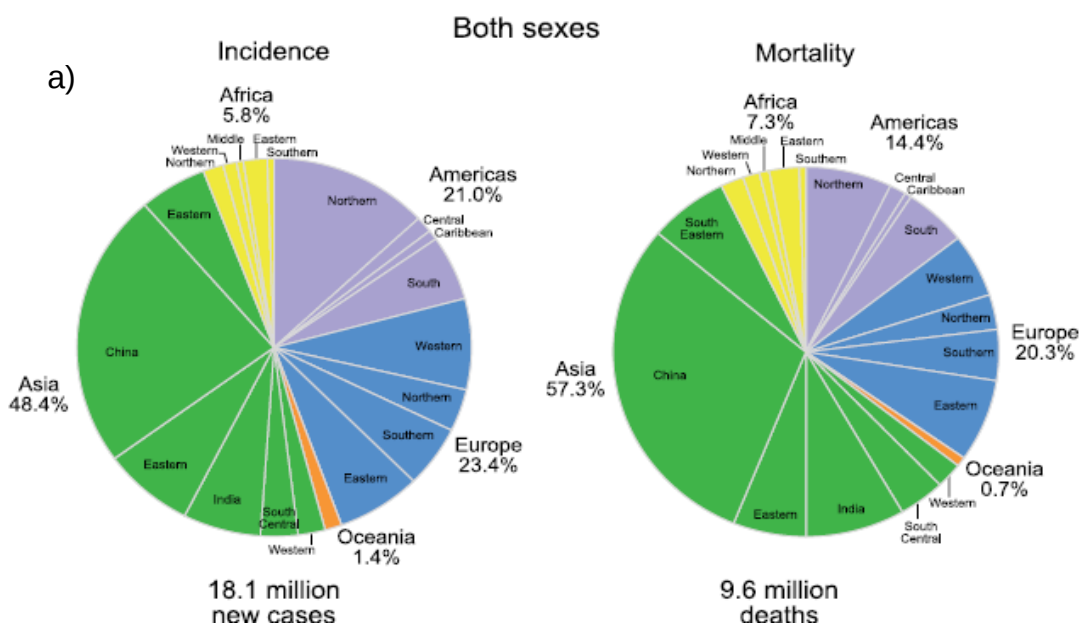
leucemia puede desarrollarse hasta en el 50 % de los niños y alrededor del 20 % de los adultos con algunos tipos de LNH (Sierra & López, 2012).

Hasta el momento no existe un método altamente eficaz para el tratamiento de cáncer, y un número representativo de pacientes bajo tratamiento no son curados y sólo se prolonga la sobrevivencia y el riesgo de recurrencia (Schulz, 2007; Avendaño-Menéndez, 2008). Los tratamientos convencionales para la mayoría de los diferentes tipos de cáncer son la cirugía, quimioterapia y la radioterapia, los cuales pueden ser altamente tóxicos debido a su falta de selectividad sobre células cancerígenas, aunado a una baja eficacia del tratamiento debido a una progresión genéticamente inestable, donde nuevas mutaciones ocurren, lo cual confiere desarrollo de resistencia y requerimientos de dosis más altas; la selección de uno de ellos depende de la etapa en que se encuentre el cáncer (Schulz, 2007; Schlaepfer & Mendoza-Espinoza 2010; Pei *et al.*, 2012). Por lo que, la adecuación de los tratamientos terapéuticos ha dado lugar al desarrollo de métodos moleculares sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR y su variante RT-PCR), capaces de detectar la persistencia de células cancerígenas portadoras de genes anormales aún en niveles bajos denominada como enfermedad mínima residual (EMR) (Gabert *et al.*, 2003). Adicionalmente, diversas investigaciones están llevándose a cabo para lograr un tratamiento efectivo contra el cáncer, encontrándose entre estas la sensibilización de las células cancerígenas a tratamientos convencionales mediante el empleo combinado de compuestos citotóxicos obtenidos de plantas (Schulz, 2007; Pei *et al.*, 2012).

2.1.1 El cáncer como problema de salud pública

El cáncer es considerado un serio problema de salud pública a nivel mundial ya que es de las principales causas de muerte y su incidencia representa casi el mismo índice de mortalidad; para el año 2018 se estimó un total de 18.1 millones de nuevos casos, de los cuales hubo 9.6 millones de defunciones; de este total, la incidencia y mortalidad depende de la zona geográfica, siendo los continentes Americano y Europeo aquellos

con el mayor porcentaje de incidencia, además del sexo del paciente (Fig. 1a-c). Las razones de dichas cifras son complejas, pero son reflejo tanto del envejecimiento como del crecimiento poblacional, así como los cambios en la prevalencia y distribución de los principales factores de riesgo del cáncer, asociados con el desarrollo socioeconómico (Bray *et al.*, 2018), de manera que no hay una sola causa para el desarrollo del cáncer, es multifactorial, aunque es relevante destacar que el 80% de los tumores se deben a cambios en los genes por mutaciones adquiridas causadas por sustancias carcinogénicas ambientales como las radiaciones, tóxicos químicos, mala o deficiente alimentación, cuestiones hormonales, estrés, virus y bacterias, mientras que el 15% de los tumores se deben a mutaciones espontáneas, y el restante 5% son por herencia familiar (Jaramillo, 2010).



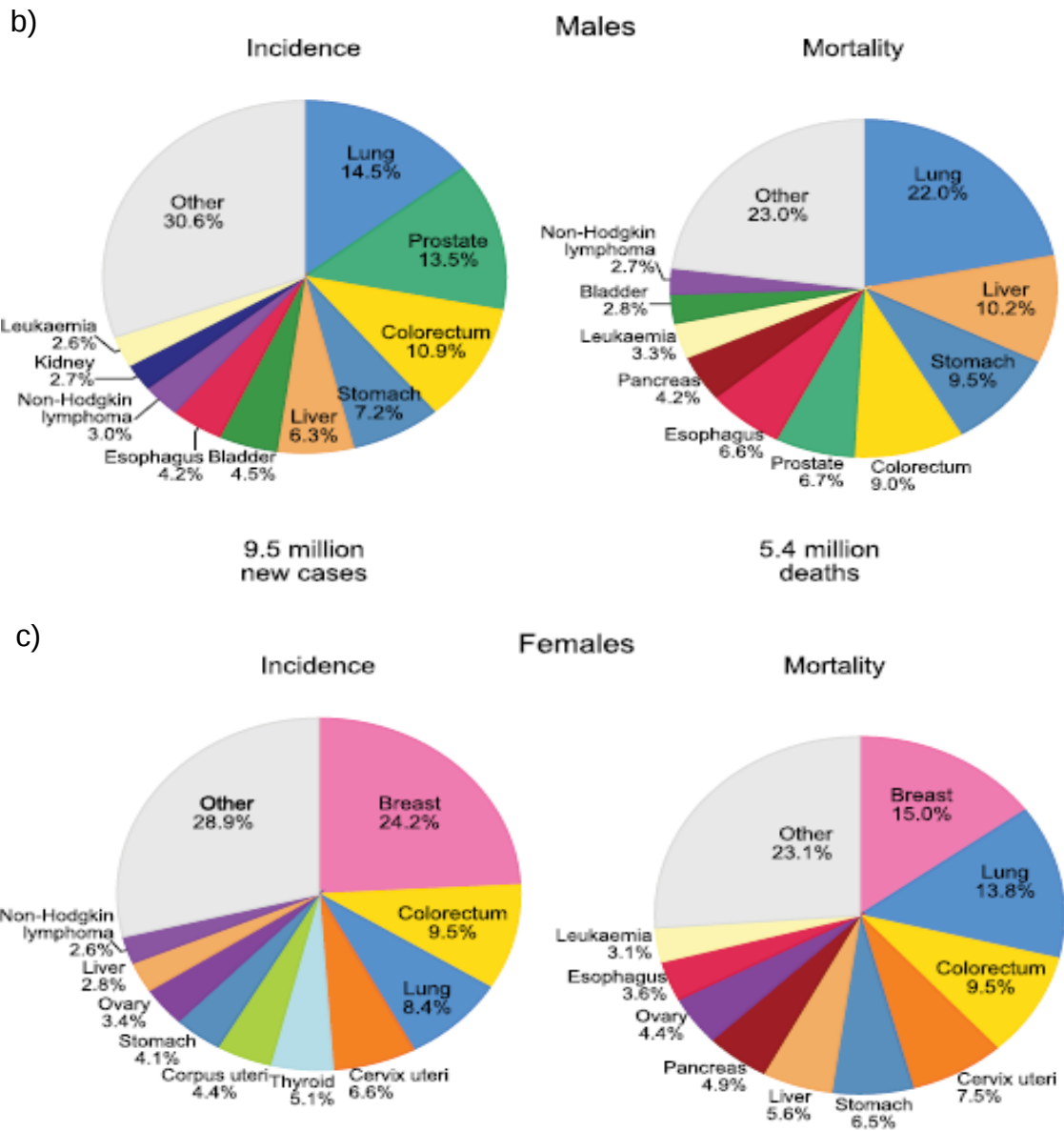


Fig. 1. Estadísticas del cáncer en el mundo a) porcentaje de incidencia y mortalidad del cáncer por continente, y porcentaje y mortalidad por tipo de cáncer en b) hombres y en c) mujeres (tomado de Bray *et al.*, 2018).

En el caso específico de México, para el año 2015, la mortalidad por cáncer fue de 85,201 casos reportados, los cinco Estados con la mayor mortalidad por número fueron: Estado de México (9,857), Ciudad de México (8,598), Veracruz (6,346), Jalisco (5,772) y Nuevo León (3,953) (Aldaco-Sarvide *et al.*, 2018). Mientras que para el año 2017, el cáncer fue la tercera causa de muerte (INEGI, 2018). Entre los tipos de cáncer, los linfomas no-Hodgkin son los tipos de cáncer con alta incidencia y en incremento en

la población (Fig. 2a-d) (Cuevas-Urióstegui *et al.*, 2003, Meneses-García *et al.*, 2012, Torres-Sánchez *et al.*, 2014).

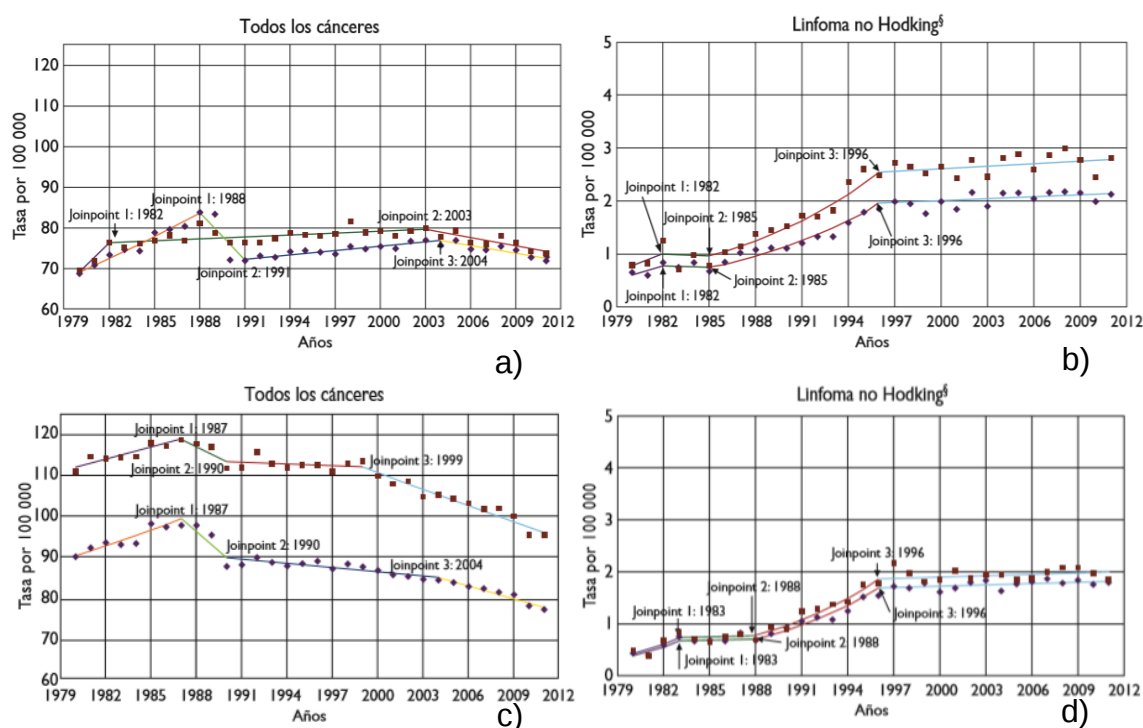


Fig. 2. Incidencia del cáncer en México entre el periodo de 1980 a 2011, en hombres a) todos los tipos de cáncer y b) LNH, y en mujeres c) todos los tipos de cáncer y d) LNH; tomado de Torres-Sánchez *et al.*, 2014.

Actualmente gracias a los tratamientos convencionales sobreviven más del 90% de los pacientes diagnosticados con LH y de 90-95% en los casos localizados de LNH y de 70-85% en los casos más avanzados o diseminados de LNH (Sánchez de Toledo & Sábado, 2016). Sin embargo, existe una población que es resistente a los fármacos y que eventualmente muere. Esto da pauta a la investigación y desarrollo de nuevas terapias alternativas que permitan al clínico ofrecer al paciente una alternativa terapéutica a esta población refractaria al tratamiento. Algunas de estas alternativas involucran compuestos bioactivos citotóxicos extraídos de plantas.

2.2 Compuestos bioactivos derivados de plantas contra el cáncer

Los compuestos bioactivos producidos en plantas forman parte de un grupo de compuestos conocidos como metabolitos secundarios (Mulabagal & Tsay, 2004), que

son compuestos de bajo peso molecular que participan en la adaptación de las plantas a su medio ambiente y que no afectan directamente a su desarrollo y crecimiento. Debido a su potencial actividad biológica, muchos metabolitos secundarios contenidos en el material vegetal de plantas medicinales, a través de diferentes preparaciones han sido usados en la medicina tradicional por siglos. Hasta ahora, cerca del 60% de fármacos contra el cáncer son hechos de metabolitos secundarios de plantas medicinales o de sus análogos semisintéticos (Wilson & Roberts, 2012).

Los metabolitos secundarios de plantas se clasifican en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados. Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides, y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides. Por otro lado, entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, coumarinas, flavonoides, taninos, lignanos, quinonas, estilbenos, curcuminoides, entre otros. Mientras que los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glicósidos (Aválos & Pérez-Urria, 2009; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

En particular, las lactonas sesquiterpénicas (LS) y los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios los cuales han mostrado efectos significativos contra el cáncer (Chadwick *et al.*, 2013). Las LS son metabolitos terpenoides que han sido aisladas de especies vegetales pertenecientes a la familia Asteraceae, las cuales han mostrado actividad biológica significativa para sensibilizar células de tumores a tratamientos convencionales; se encuentran en casi todas las partes del cuerpo de la planta en concentraciones significativas y, generalmente se acumulan en células especializadas secretoras (laticíferos) o en vacuolas ante el estrés biótico (Chadwick *et al.*, 2013). Estos compuestos son capaces de regular la expresión génica activando/desactivando factores de transcripción presentes de manera constitutiva en células cancerígenas (Gach *et al.*, 2014). La partenólida (PTN), y la helenalina (HLN) son LS que han mostrado un efecto tóxico significativo sobre diversas células cancerígenas (citotoxicidad). Adicionalmente, especies de la familia Asteraceae

pueden producir compuestos fenólicos (Chadwick *et al.*, 2013), de los cuales, algunos tienen la capacidad de inducir apoptosis al inhibir el factor NF- κ B, o unirse a proteínas cinasas implicadas en las rutas de transducción de señales en procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la supervivencia, la migración o la angiogénesis (Soobratte *et al.*, 2005), y también pueden ser sinérgicos en terapias convencionales anti-cáncer (Alipieva *et al.*, 2014). El verbascósido (VB) es un compuesto fenólico que ha mostrado actividad anti-proliferativa *in vitro* en células de tumor (Alipieva *et al.*, 2014).

2.2.1 Actividades biológicas de la partenólida

La PTN (Fig. 3) induce la muerte celular (apoptosis) en diversas líneas celulares de cáncer (Tabla 1) con escaso efecto sobre aquellas del tipo normal (George *et al.*, 2012), además, mostró un efecto radiosensibilizador en células de cáncer de próstata (Pajak *et al.*, 2008), y ha sido evaluada como fármaco (fase I) (George *et al.*, 2012). Se ha encontrado que inhibe el factor de transcripción NF- κ B y STAT-3, que en células cancerígenas donde actúan como anti-apoptóticos, y reduce la actividad de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Pajak *et al.*, 2008). La PTN en combinación con otros agentes como el 5-fluorouracilo o cisplatino ha mostrado toxicidad contra células cancerígenas como las de leucemias (Czyz *et al.*, 2010; Se-Lim *et al.*, 2013).

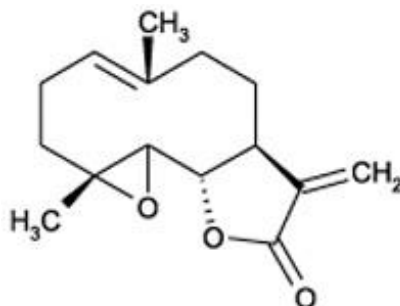


Fig. 3. Estructura química de la partenólida

A nivel molecular (Fig. 4), la acción citotóxica de este compuesto involucra diferentes mecanismos, está asociada con la inhibición del factor NF- κ B y de la vía de señalización MAPK, inducción de estrés oxidante y disfunción mitocondrial,

modulación de la metilación del ADN e interfiere con los microtúbulos (Gach *et al.*, 2015).

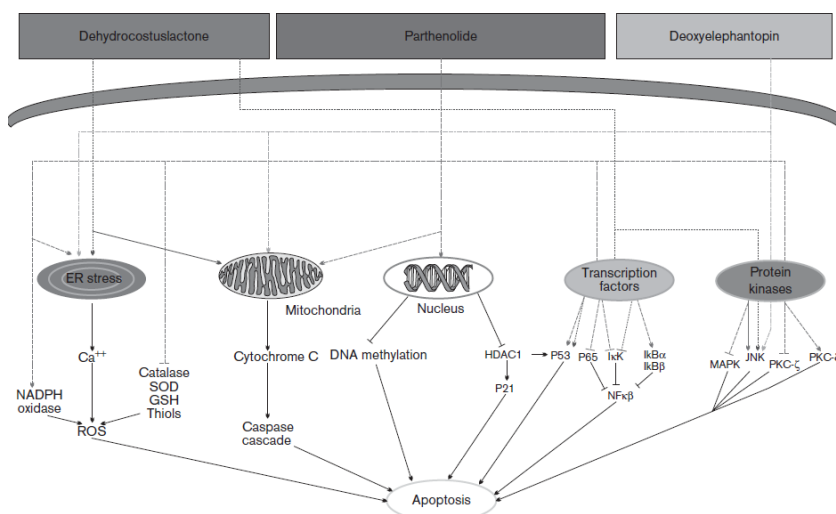


Fig. 4. Mecanismos moleculares que median la inducción de apoptosis por medio de la PTN (tomada de Orofino *et al.*, 2012)

La PTN ha mostrado en estudios *in vitro* inducir apoptosis, inhibir el ciclo celular y la proliferación, y disminuye la metástasis en varias líneas celulares de cáncer (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad citotóxica de la PTN en líneas celulares de cáncer

Modelo biológico	Tipo de cáncer	IC ₅₀ (μM) o % de muerte celular	Tiempo de exposición	Referencias
MCF-7/LCC1 MCF-7/LCC9	Mama	0.5 μM	24h	Riggins <i>et al.</i> , 2005
SCK JCK Cho-CK Choi-CK SK-MEK-5 SK-MEL-2 A549 NCIH522	Colangiocarcinoma Melanoma Pulmón	10μM - 49.5% 35.2% 30.3% 35.5 % 62% 54.5% 32.5% 22.7%	72h	Jong-Hyun <i>et al.</i> , 2005
HBL-100 MDA-MB-231	Mama	2 μM – 13.5% 5 μM – 24%	24h	Sweeney <i>et al.</i> , 2005
BxPC-3 MIA-PaCa-2 PANC-1	Páncreas	6 μM 2 μM 8 μM	48h	Yip-Schneider <i>et al.</i> , 2005
Hep3B HepG2 PLC	Hepatocarcinoma	~6-7 μM >10 μM	72h	Ralstin <i>et al.</i> , 2006
A549 TE671 HT-29	Pulmón Meduloblastoma Adenocarcinoma de colon	4.3 μM 6.5 μM 7.0 μM	96h	Parada-Turska <i>et al.</i> , 2007

U87MG	Glioblastoma	20 μ M – 30-40%	24h	Anderson & Bejcek, 2008
MCF-7 (esferoides)	Mama	1 μ M – 33.2%	72h	Zhou <i>et al.</i> , 2008
BxPC-3	Páncreas	14.5 μ M	48h	Liu <i>et al.</i> , 2010
U373 U87 U138M6 C6	Glioblastoma	13 μ M 17 μ M 22 μ M 29 μ M	36h	Zanotto-Filho <i>et al.</i> , 2011
SW480	Colon	30 μ M	24h	Se-Lim <i>et al.</i> , 2013
U87MG	Glioblastoma	5 μ M - 15% 10 μ M - 65%	48h	Nakabayashi & Shimizu, 2012
MCF-7 MDA-MB-231	Mama	9.5 μ M 8.0 μ M	48h	Wyřębska <i>et al.</i> , 2013
DMBC2; 8; 9; 10 y 12	Melanoma	24 μ M – 25-40%	48h	Czyz <i>et al.</i> , 2013
HepG2	Hepatoblastoma	9.3 μ M	48h	Sun <i>et al.</i> , 2014
MCF-7 MDA-MB-231	Mama	17.6 μ M 16.6 μ M	48h	Lu <i>et al.</i> , 2014
MCF-7	Mama	9.5 μ M	24h	Gach <i>et al.</i> , 2015

2.2.2 Actividades biológicas de la helenalina

La HLN (Fig. 5) ha demostrado inhibir el factor de transcripción NF- κ B, y fue citotóxico para células de cáncer de pulmón GLC4 con un IC₅₀ de 0.5 μ M (Woerdenbag *et al.*, 1995). El mecanismo de acción asocia a que dicha lactona sesquiterpénica inhibe la activación de NF- κ B y NF-AT, y como consecuencia, se disminuye la producción de citocinas inflamatorias, lo cual previene el reclutamiento de células inmunitarias, células T y B, así como macrófagos y neutrófilos, reduciendo así la inflamación. La HLN se une directamente al grupo tiol en el aminoácido cisteína en el NF- κ B y NF-AT, bloqueando su actividad como factores de transcripción e induciendo apoptosis (Chaturvedi, 2011). Tanto como la estructura α -metilen- γ -lactona y ciclopentenona α,β -insaturada en la HLN están involucradas en este mecanismo (May, 2013). La actividad citotóxica de LS aisladas ha sido demostrada en líneas celulares de cáncer en las líneas GLC4 (carcinoma de pulmón humano) y COLO320 (cáncer de colon humano). Además, la helenalina muestra efecto inhibitorio sobre la 5-lipoxigenasa y leucotrieno C4 sintasa en células sanguíneas humanas (Petrova *et al.*, 2012). También se

demostró la actividad citotóxica de la HLN en células T47D (cáncer de mama) combinado con β -ciclodextrina (mejora la estabilidad y solubilidad) durante 24, 48 y 72 h, encontrando un IC_{50} de 2.0, 1.6 y 1.4 μ M, respectivamente, de manera que la respuesta fue dependiente de la dosis y del tiempo de exposición (Ghasemali *et al.*, 2013).

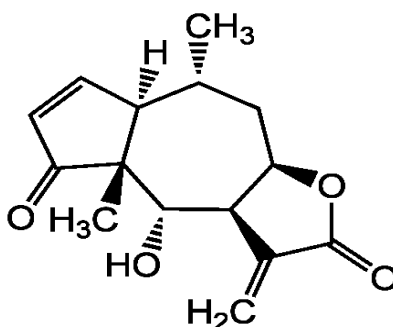


Fig. 5. Estructura química de la helenalina

2.2.3 Actividades biológicas del verbascósido

El verbascósido es un fenilpropanoide glicosilado (Fig. 6), el cual se ha reportado que induce apoptosis modulando la respuesta telómero-telomerasa en la línea celular de leucemia promieloide humana HL-60, donde inhibió su proliferación bloqueando ciclinas y proteínas cinasas dependientes de ciclinas reguladoras del ciclo celular (Alipieva *et al.*, 2014). También se ha determinado su efecto antiinflamatorio en vías reguladas por el factor NF- κ B al inhibirlo; posee actividad antiinflamatoria, fotoprotectora, antioxidante y antibacteriana (Vertuani *et al.*, 2011; Alipieva *et al.*, 2014), de igual manera disminuye las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno inhibiendo la peroxidación de lípidos y reduce la activación del NF- κ B y su translocación al núcleo modulando así las reacciones inflamatorias (Esposito *et al.*, 2010; Carrillo-Ocampo *et al.*, 2013).

En un ensayo de citotoxicidad con la línea celular de leucemia promielocítica humana HL60 se encontró una IC_{50} de 60 μ M a 72 h de tratamiento usando el estándar de verbascósido (Anter *et al.*, 2014).

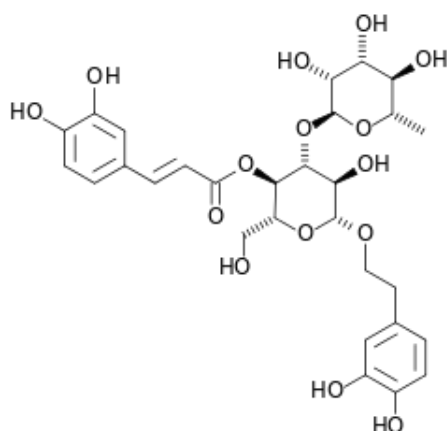


Fig. 6. Estructura química del verbascósido

2.3 Especies de plantas productoras de LS y CF

2.3.1 *Arnica montana*

2.3.1.1 Descripción botánica

Es una planta originaria de Europa central y meridional, actualmente también se encuentra en Asia y América del Norte. Es una planta perene, de tallo erguido que alcanza los 15 a 60 cm de altura y sus hojas ovales forman una roseta basilar en el suelo. Las flores de color amarillo son grandes y terminales, tallo hueco, veloso y áspero, ramas colocadas de 2 en 2, simples, derechas, desnudas. Las hojas son ovaladas y ásperas por encima y lampiñas por el envés. Las semillas de color pardo, con un vilano que las rodea. Las flores y la raíz tienen sabor acre, aromático y olor fuerte, que hace estornudar (Fig. 7) (del Puerto *et al.*, 2013).



Fig. 7. Descripción morfológica de *A. montana*

2.3.1.2 Importancia medicinal y farmacológica

Las flores son extensamente usadas para el tratamiento tópico de moretones, reumatismo, osteoartritis, osteoartrosis y esguinces en preparaciones fitofarmacéuticas como son ungüentos, cremas y geles (del Puerto *et al.*, 2013). También se ha reportado que tiene potencial para su uso por su actividad antioxidante, antibiótica y citotóxica, así como un efecto colerético y colagogo, aunque es usado casi exclusivamente por su efecto antiinflamatorio, especialmente en los estados inflamatorios iniciales (Petrova *et al.*, 2012; Pljevljakušić *et al.*, 2012).

2.3.1.3 Constituyentes químicos

Alrededor de 150 sustancias biológicamente activas han sido aisladas e identificadas. Las más importantes de ellas son las lactonas sesquiterpénicas; la HLN se ha determinado en *Arnica montana* (Petrova *et al.*, 2012). También contiene flavonoides en su forma de glucósidos (apigenina, hispidulina, eupafolina, kaempferol y quercetina), glucorónidos y agliconas; aceites esenciales, compuestos de ácidos grasos, derivados del timol, monoterpenos y sesquiterpenos. Otros constituyentes son los carotenoides, diterpenos, arnidiol (un triterpeno), alcaloides (tusilagina e

isotusilagina), poliacetilenos, cumarinas (umbeliferona y escopoletina), ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácido caféico y cinarina), lignanos (Jurkiewicz *et al.*, 2010; Petrova *et al.*, 2012; Nikolova *et al.*, 2013).

En el aceite esencial de raíces y rizomas de *A. montana* se identificaron 35 compuestos de un total de 38 detectados, el grupo predominante de compuestos fueron los hidrocarburos aromáticos, principalmente oxigenados, todos los compuestos fueron identificados como derivados del timol. Los principales constituyentes fueron: 2,5-dimetoxi-p-cimeno, timol metil éter, p-metoxiheptanofenona y 2,6-diisopropilanisola. Los terpenos estuvieron presentes en bajas cantidades; se encontró transcariofileno y germacreno D. El rizoma contiene cantidades mayores de timol metil éter, p-diisopropil-benceno, acetato de pincoteno, p-metoxiheptanona, p-cimeno y α -felandreno, mientras que las raíces contenían cantidades mayores de 2,5-dimetoxi-p-cimeno, 2,6-diisopropilanisola, 7-epi-silfiperfol-5-eno y α -isocomeno (Pljevljakušić *et al.*, 2012).

Los principales constituyentes de las flores son las LS del tipo pseudoguayanólido y le confieren principalmente el efecto farmacológico de este órgano. Se han determinado también flavonoides, aceite esencial, poliacetileno, polisacáridos y triterpenos. Las LS consisten principalmente de ésteres de HLN y 11 α ,13-dihidrohelenalina con ácidos grasos de cadena corta como son acético, isobutírico, isovalérico, metacrílico y tíglico. Estos compuestos son conocidos como helenanólidos (May, 2013). En un extracto etanólico usando flores, analizado por HPLC se encontraron quercetina, rutina, apigenina y ácido clorogénico, con valores de 1.881, 1.186, 0.501 y 0.309 mg/g del extracto, respectivamente; así como otros constituyentes en menor cantidad que son el ácido gálico, ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, luteolina y miricetina (Craciunescu *et al.*, 2012).

En un extracto metanólico de hojas se identificaron los siguientes compuestos: ácido 5-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico), ácido 3,5-dicafeoilquínico (ácido isoclorogénico), ácido 1,5-dicafeoilquínico (cinarina), ácido 1-cafeoil-3-feruloilquínico,

ácido 1-cafeoil-4-feruloilquínico, ácido 1,3-dicafeoil-4-metoxioxaloilquínico y ácido 3,5-dicafeoil-4-metoxioxaloilquínico (Jaiswal *et al.*, 2011).

Mediante el análisis de GC-MS de una fracción polar de raíces transformadas de *A. montana* se encontró la presencia de 48 compuestos pertenecientes a diferentes clases de metabolitos: la flavona (crisina), ácidos fenólicos (ácido cafeíco, ácido 4-hidroxifenilactico, ácido protocatequico, ácido 2-fenil láctico y ácido m-hidroxibenzóico), ácidos orgánicos (ácido γ -hidroxibutírico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido málico, ácido succínico, ácido α -hidroxiglutarico, ácido L-(+)-tartárico, ácido 2-ceto-l-gluconico, ácido isocítrico y ácido galáctico), ácidos grasos (palmítico, mirístico, linoléico, esteárico, trans-13-octadecanóico y araquidónico) y éteres de ácidos grasos (2-monostearin trimetilsilil éter y 1-monolinoleoilglicerol trimetilsilil éter), un esteroide (β -sitosterol trimetilsilil éter). En el caso de la fracción no polar de las raíces transformadas se encontró la presencia de 22 compuestos, de los cuales destacan por su alto contenido la bis(trimetilsilil)monostearina y 1-monopalmitintrimetilsilil éter (Petrova *et al.*, 2015).

2.3.2 *Tanacetum parthenium*

2.3.2.1 Descripción botánica

Es una hierba perenne originaria de Europa que crece hasta 1 m de alto. Sus tallos son más o menos ramificados, erectos, con pelillos y glándulas. Sus hojas están alternas, pecioladas, de hasta 10 cm de largo, de contorno elíptico a anchamente ovado, divididas en segmentos que a su vez se dividen, cubiertas de pelillos y con punteaduras glandulares en su superficie. Tiene inflorescencias, compuestas de numerosas cabezuelas agrupadas en panículas redondeadas, sobre pedúnculos hasta de 8 cm de largo. Flores del disco hermafroditas, ubicadas en la parte central; la corola es un tubo que hacia el ápice se ensancha y se divide en 5 lóbulos, de color amarillo y de aproximadamente 1.5 mm de largo; los estambres alternos con los lóbulos de la corola, sus filamentos libres e insertos sobre el tubo de la corola, las anteras soldadas entre sí formando un tubo alrededor del estilo, con un apéndice conspicuo en el ápice

y la base obtusa; ovario ínfero. El fruto es seco y no se abre (indehiscente), contiene una sola semilla, se le conoce como aquenio (o cipsela), es cilíndrico, de aproximadamente 1.5 mm de largo, con 5 a 10 costillas longitudinales, sin pelillos; en el ápice del fruto se presenta una estructura llamada vilano en forma de corona diminuta (Fig. 8) (McVaugh, 1984; Rzedowski-Rzedowski, 2001).



Fig. 8. Descripción morfológica de *T. parthenium*

2.3.2.2 Importancia medicinal y farmacológica

Esta planta ha sido usada en la medicina tradicional para el tratamiento de condiciones de inflamación, mareo, artritis, fiebre, desordenes menstruales, migraña, epilepsia, reumatismo y ha presentado actividad anti protozoaria y anticancerígena (Tiuman *et al.*, 2005; Izumi *et al.*, 2008; Asgari & Parvin, 2013).

2.3.2.3 Constituyentes químicos

Se han identificado alrededor de 30 LS en *T. parthenium*, tales como la PTN, artecanina, artemorina, balcanina, canina, costunólido, 10-epicanina, epoxiartemorina, 1- β -hidroxiarbusculina, 3- β -hidroxycostunólido, 8- α -hidroxiestagiatina, 8- β -hidroxireynosina, 3- β -hidroxipartenólida, manolialida, reinosina, santamarina, epoxisantamarina, secotanapartenólida A, secotanapartenólida B, tanapartina- α -

peróxido y 3,4- β -epoxi-8-deoxicumambrina B, entre otras (Majdi *et al.*, 2011; Pareek *et al.* 2011). La PTN es el mayor constituyente de *Tanacetum parthenium* (L.) (George *et al.*, 2012).

También se han encontrado los siguientes compuestos: 6-hidroxicamferol 3,6-dimetil éter, tanetina, quercetagetina 3,6-dimetil éter, quercetagetina 3,6,3'-trimetil éter (acompañado por el isómero 3,6,4'-trimetil éter), quercetina, apigenina, apigenina 7-glucurónido, luteolina, luteolina 7-glucurónido, crisoeriol, santina, jaceidina, centaureidina, cumarina isofraxidina, el 9-epipectacol B y el (2-gliceril)-O-coniferaldehído a partir de raíces (Banthorpe *et al.*, 1989; Pareek *et al.*, 2011). Así como el alcanfor, canfeno, p-cimeno, acetato de bornilo, tricileno, α -tujeno, α -pineno, β -pineno, α -felandreno, α -terpineno, γ -terpineno, crisanteona, pinocarvona, borneol, terpineno-4-ol, p-cimen-8-ol, α -terpineol, mirtenal, carvacrol, eugenol, acetato transmirtenol, isobornil 2-metil butanato y óxido cariofileno (Shafaghat & Salimi, 2008; Pareek *et al.*, 2011).

2.3.3 *Buddleja cordata*

2.3.3.1 Descripción botánica

Buddleja cordata Humb. Bonpl. & Kunth (Buddlejaceae), comúnmente conocida como tepozán es una especie dioica que va de arbusto a árbol, midiendo de 1 a 20 m de altura; sus hojas son de 10 a 15 cm de largo, pecioladas, de base ancha generalmente redondeada o subcordada, borde entero o aserrado, angostamente lanceoladas o aovadas en la punta, haz color verde claro y envés pubescente; flores pequeñas amarillas y aromáticas agrupadas en amplias panículas terminales, corola amarillenta, generalmente con un toque anaranjado en la garganta. Se distribuye ampliamente en México desde los estados del norte de Sinaloa, Chihuahua y Durango hasta los estados del sur de Oaxaca y Chiapas (Fig. 9) (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2006; Martínez, 1989; Sánchez, 1980; Gallardo-Vázquez, 1994).



Fig. 9. Descripción morfológica de *B. cordata*

2.3.3.2 Importancia medicinal y farmacológica

Las hojas son empleadas como infusión para tratar la diarrea, dolor de cabeza, reumatismo, dolor de cintura, calambres musculares, enfermedades de la piel e inflamaciones, hemorragias nasales e infecciones intestinales (Gallardo-Vázquez, 1994; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 1999); la decocción de raíces y corteza son usadas como diurético y para tratar afecciones de riñón (Martínez, 1989). También se le han encontrado propiedades antipiréticas, analgésicas, antimicrobianas, amebicidas, antiparasitarias y un efecto neuroprotector (Pérez-Barrón *et al.*, 2014).

2.2.1.3.3 Constituyentes químicos

Se han encontrado principalmente compuestos fenólicos como flavonoides y fenilpropanoides y son particularmente abundantes la siringina, linarina y VB (Avila *et al.*, 2014). Otros compuestos identificados son los ácidos hidroxicinámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico; terpenos como aucubina y buddledina A (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2019).

2.4 Cultivo de tejidos vegetales para la obtención de compuestos bioactivos

Las aplicaciones biotecnológicas, particularmente el cultivo de tejidos vegetales (también conocido por cultivo vegetal *in vitro*) juega un papel importante en desarrollar alternativas para la producción de sustancias medicinales deseables a partir de plantas. El cultivo vegetal *in vitro* permite la producción de metabolitos secundarios bajo condiciones controladas y una producción segura, predecible e independiente de condiciones de suelo o clima (Mulabagal & Tsay, 2004). La acumulación de metabolitos secundarios puede ser mejorada con la aplicación de diferentes factores de estrés, seleccionando las líneas celulares altamente productoras, empleando sustancias precursoras y técnicas de inmovilización (Hussain *et al.*, 2012). Los cultivos de callos y de células en suspensión son fuente de sustancias biológicamente activas de valor económico, por su rápido crecimiento y acumulación de biomasa. La cantidad de callo inducido depende del genotipo de la planta, el tipo de explante y los constituyentes del medio de cultivo, como los reguladores de crecimiento vegetal. La alta capacidad biosintética de cultivos en suspensión para su cultivo en grandes masas fue probada a nivel biorreactor, lo cual hace factible el cultivo a gran escala por su estabilidad a largo plazo como fuente confiable de metabolitos secundarios (Petrova *et al.*, 2012).

2.4.1 Cultivo de tejidos vegetales en *A. montana*, *T. parthenium* y *B. cordata*

Debido a que se han reportado fluctuaciones en la producción de metabolitos secundarios, tales como las LS o los CF, por las especies *A. montana*, *T. parthenium* y *B. cordata* (Chadwick *et al.*, 2013; Grech-Baran, 2012; Petrova *et al.*, 2012), se han establecido cultivos de tejidos vegetales para dichas especies con el objetivo de producir dichos compuestos de manera controlada (Brown *et al.*, 1996; Grech-Baran, 2012; Petrova *et al.*, 2012).

Para lo cual se realizó la micropropagación *in vitro* de semillas de *T. parthenium* en medio MS conteniendo 0.2% de ácido giberélico (GA₃). Los explantes fueron cultivados *in vitro* en medio MS usando diferentes reguladores del crecimiento vegetal (0.5, 1 y 2

mg/L de BAP, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L de ANA y combinaciones de ambas) y fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, fructosa y almidón a 12.5, 25 y 50 g/L). El contenido de PTN en diferentes cultivos de brotes establecidos fue analizado y comparado con el presente en plantas crecidas a campo abierto. Los resultados revelaron que usando MS al 50% conteniendo 50 g/L de glucosa o fructosa como fuente de carbono y 0.5 mg/L de bencil-aminopurina (BAP) se obtiene un mayor contenido de PTN (0.127 mg/g) que el encontrado en plantas crecidas a campo abierto (0.098 mg/g) (Rateb *et al.*, 2007).

Por otra parte, los cultivos *in vitro* de *Buddleja cordata* fueron establecidos a partir de explantes foliares con la finalidad de producir fenilpropanoides con propiedades terapéuticas. Se indujo callo con 0.1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.5 mg/L de cinetina (Kin), así como raíz indirecta con ácido naftalenacético (ANA) y Kin. El verbascósido fue el fenilpropanoide mayoritariamente producido en los cultivos *in vitro* con 68.29 mg/g de biomasa seca en raíces y 86.26 mg/g en callo, superior al encontrado en hojas de *B. cordata* crecida a campo abierto: de 10.10 mg/g (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009).

2.5 Bioensayos de citotoxicidad con líneas celulares de cáncer

Tanto los estudios de ciencia básica como los ensayos clínicos son componentes necesarios en el proceso del descubrimiento y evaluación de fármacos para el cáncer (Voskoglou-Nomikos *et al.*, 2003). Las líneas celulares de cáncer humano representan uno de los pilares de la biología del tumor y del descubrimiento de fármacos a través de una manipulación experimental fácil (Barretina *et al.*, 2012). La rápida expansión del uso de líneas celulares de cáncer para predecir la eficacia clínica de nuevos agentes ha influenciado el curso del desarrollo de drogas y ahora es una importante herramienta para la industria biotecnológica y farmacológica, en donde los esfuerzos son enfocados aceleradamente a terapias dirigidas a blancos moleculares en cáncer. Resultados recientes han demostrado que las líneas celulares derivadas de tumores retienen en gran parte las características genómicas del tumor primario, reforzando

aún más la validez de las aproximaciones en el descubrimiento clínico significativo que correlaciona la genética celular del tumor y su sensibilidad o resistencia a las drogas (Gillet *et al.*, 2011). Los tumores primarios de donde son originarias las líneas celulares implican que son sustitutos genéticamente válidos de tumores *in vivo* (Sharma *et al.*, 2010). El desarrollo de nuevos agentes más efectivos es esencial para el progreso de la quimioterapia para el cáncer. Por lo tanto, las líneas celulares son una gran herramienta para predecir los mecanismos de acción de nuevos compuestos (Yamori, 2003).

3 JUSTIFICACIÓN.

El linfoma es una neoplasia hematopoyética que representa un serio problema de salud a nivel mundial y aunque los tratamientos convencionales muestran resultados alentadores, la toxicidad y el desarrollo de resistencia a los fármacos, son un obstáculo para la eliminación completa de las células transformadas. Por ello es necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, que permitan eliminar completamente a los linfomas refractarios. Una de estas alternativas es el empleo de los compuestos derivados de plantas como alternativa a las estrategias del desarrollo de fármacos contra el cáncer. Las plantas medicinales como *Arnica montana*, *Tanacetum parthenium* y *Buddleja cordata*, son especies a la que se les atribuye propiedades para tratar el cáncer, ya que contienen algunos metabolitos secundarios como las lactonas sesquiterpénicas y los compuestos fenólicos que han sido asociados a dicha propiedad. El cultivo de tejidos vegetales permite la producción de compuestos de interés farmacológico de manera sustentable y sostenible, ayuda a conservar los recursos vegetales en su hábitat y evita que las especies puedan estar amenazadas o en peligro de extinción por su explotación para su uso medicinal. La valoración preliminar del potencial citotóxico de fracciones del extracto metanólico derivado de cultivo de tejidos vegetales de dichas especies contribuirá en el aislamiento de principios bioactivos y sistemas de producción sustentables que tengan actividad farmacológica como alternativa terapéutica del cáncer y en particular de los Linfomas refractarios a los fármacos.

4 HIPÓTESIS.

Fracciones del extracto metanólico de cultivos de células y órganos vegetales de las especies *A. montana*, *T. parthenium* y *B. cordata* conteniendo lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos, metabolitos secundarios que se han reportado poseen actividad citotóxica, mostrarán actividad citotóxica sobre una línea celular de Linfoma no Hodgkin (Linfoma de Burkitt).

5 OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad citotóxica de las fracciones de extractos metanólicos obtenidos a partir del cultivo de células de *A. montana*, *T. parthenium* y *B. cordata* sobre una línea celular de Linfoma no Hodgkin (Linfoma de Burkitt RA 1).

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de reguladores del crecimiento vegetal sobre la callogénesis y/o morfogénesis en explantes foliares para el establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *A. montana*.
2. Fraccionar extractos metanólicos del cultivo *in vitro* de *A. montana*, *T. parthenium* y *B. cordata*.
3. Evaluar la actividad citotóxica de las fracciones (en ausencia o presencia de un agente quimioterapéutico) que presentan mayor contenido de LS y CF sobre células de Linfoma no Hodgkin.

6 MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Cultivo *in vitro* de especies vegetales

6.1.1 Cultivo de células en suspensión de *Arnica montana* (CCSA_m)

6.1.1.1 Material vegetal

Se emplearon semillas de *A. montana* adquiridas del Rancho Los Molinos (www.rancholosmolinos.com) para su germinación aséptica *in vitro*; las plántulas resultantes de la germinación *in vitro* fueron fuente de explantes foliares para realizar el experimento para la inducción de callo y/o respuestas morfogénéticas y el establecimiento de la línea celular vegetal a emplear.

6.1.1.2 Establecimiento del cultivo aséptico

Las semillas fueron colocadas en el interior de una bolsita de papel filtro para ser lavadas al chorro de agua durante 15 min con detergente, después se sumergieron en una solución de antibióticos (200 mg/L de ampicilina, 200 mg/L de eritromicina y 200 mg/L de tetraciclina) por 30 min, luego se pasaron a una solución de fungicidas (10 g/L de fungoxyl y 10 mL/L de bravo 720®) por 30 min, posteriormente se pasaron a una solución de etanol al 70% (v/v) por 15 s, seguido de una inmersión en una solución de cloro al 20% (v/v) por 15 min. Por último, se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril en la campana de flujo laminar horizontal para retirar los residuos del tren de lavado. Las semillas enjuagadas se sembraron en frascos tipo Gerber con medio sólido conteniendo 5 semillas en cada frasco y se incubaron para su germinación y subsecuente desarrollo de plántulas.

6.1.1.3 Medio de cultivo y condiciones de incubación

Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog 1962) al 50% suplementado con 30 g/L de glucosa y solución antioxidante (150 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico). Se empleó agua destilada para la preparación del medio de cultivo. El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.7-5.8, se esterilizó en autoclave a 121 °C por

18 min. Se empleó medio de cultivo semisólido con 3 g/L de fitagel sin reguladores del crecimiento vegetal para el establecimiento del cultivo aséptico de semillas; y para la inducción de callo/respuesta morfogénica se adicionó al medio de cultivo diferentes reguladores del crecimiento vegetal a diferentes concentraciones (sección 6.1.1.4). Para el establecimiento del cultivo de células en suspensión se emplearon matraces conteniendo la quinta parte del volumen total con medio de cultivo líquido. Las condiciones del cuarto de incubación consistieron en un fotoperiodo de 16 h de luz fluorescente blanca ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en donde se colocaron los frascos con medios de cultivo sólido, así como los medios de cultivo líquido en un agitador orbital a 110 rpm.

6.1.1.4 Establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Arnica montana*

Se inocularon explantes foliares de plántulas asépticas crecidas durante 4 semanas a partir de su germinación en medio de cultivo adicionado de las siguientes combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal: auxinas más citocininas: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) + Kin (cinetina) (tratamiento codificado como DK), 2,4-D + BAP (6-N-Bencilaminopurina) (tratamiento codificado como DB), ANA (ácido 1-naftalenacético) + BAP (tratamiento codificado como AB), ANA + Kin (tratamiento codificado como AK), AIA (ácido indolacético) + Kin (tratamiento codificado como IAK), AIA + BAP (tratamiento codificado como IAB), AIB + Kin (tratamiento codificado como IBK), AIB (ácido indol 3-butírico) + BAP (tratamiento codificado como IBB), Pic (picloram) + Kin (tratamiento codificado como PK) y Pic + BAP (tratamiento codificado como PB) a las concentraciones de 0.5+0.5, 0.5+1.0, 1.0+0.5, 1.0+1.0, 2.5+2.5 y 5.0+5.0 mg/L para la inducción de callos/respuestas morfogénicas en medios gelificados en frascos tipo Gerber durante un mes de cultivo. Se utilizó medio libre de RCV como control negativo.

Una vez desarrollados los callos, se seleccionaron aquellos tratamientos que presentaron el mejor crecimiento y friabilidad y se subcultivaron en medio gelificado para proliferar su biomasa durante 2 meses. Posteriormente fueron transferidos al

mismo tipo de medio de cultivo, pero libre de fitagel (medio líquido) en matraces conteniendo una quinta parte de volumen de su capacidad total, durante 6 subcultivos de 15 días cada uno para el establecimiento de los cultivos celulares en suspensión.

6.1.1.5 Cinética de crecimiento del CCSAm

La biomasa fresca se proliferó durante 15 d en matraces de 1 L conteniendo 200 mL de medio de cultivo y un inóculo de 12 g. Con dicha biomasa se realizaron 3 cinéticas de crecimiento por triplicado tomando muestra cada 3 d durante 30 d, para lo cual se inocularon matraces de 125 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo y 1.5 g de biomasa. La biomasa cosechada se filtró con una bomba de vacío, se enjuagó con agua destilada y se puso a secar en una estufa durante 24 h a 45 °C; se tomó una muestra del medio de cultivo para realizar análisis del contenido de azúcares reductores totales, como medida del consumo de la fuente de carbono durante el tiempo que duró la cinética. Cada punto de la cinética consistió en 3 unidades experimentales y tres repeticiones.

6.1.1.6 Caracterización fitoquímica del CCSAm

Se realizaron extractos metanólicos de las muestras de las células obtenidas durante la cinética previamente secadas y pulverizadas, se empleó un ultrasonificador con sonotrodo programado a 30 min a una temperatura de 50 °C, al 10% de amplitud de ultrasonido bajo régimen de pulsos por 9 s de ultrasonido por 6 s de descanso; se ocuparon 125 mL de metanol por cada 100 mg de biomasa seca. Los extractos se concentraron en un rotavapor y se llevaron a sequedad total en una estufa a 60 °C durante 24 h. Los extractos fueron utilizados para hacer el análisis fitoquímico y así seleccionar a qué día se tendría que proliferar y cosechar la biomasa para realizar la extracción y fraccionamiento.

Para la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) se usó el método de Folin-Ciocalteu con algunas modificaciones (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2016), usando ácido gálico como estándar de referencia en concentraciones de 6 a 100 µg/mL para

la curva de calibración ($y=8.2506x-0.0048$, $R^2=0.9995$), siendo reportados los resultados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g). Se mezclaron 3.75 mL de agua destilada con 0.5 mL de extracto, estándar o disolvente y 0.25 mL del reactivo de Folin, se dejó reposar por 5 min y se agregó 0.5 mL de una disolución de carbonato de sodio al 20% (p/v), se incubó por 30 minutos en oscuridad y se leyó la absorbancia a 725 nm.

En la determinación de flavonoides totales (FvT) se usó el método reportado por Woisky y Salatino (1998) con algunas modificaciones, usando quercetina como estándar de referencia en concentraciones de 0.35 a 100 $\mu\text{g/mL}$ ($y=10.612x-0.004$, $R^2=0.9919$), siendo reportados los resultados como miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg EQ/g). Se mezclaron 1.5 mL de tricloruro de aluminio al 2% en metanol (p/v) con 1.5 mL de extracto, estándar o disolvente, se incubó durante 10 min en oscuridad y se leyó la absorbancia a 415 nm.

Para la cuantificación de glucósidos fenilpropanoides totales (GFPT) se usó el ensayo de Arnow según Lillo *et al.* (2016) con algunas modificaciones, usando verbascósido como estándar de referencia a concentraciones de 6 a 100 $\mu\text{g/mL}$ ($y=2.6609x-0.019$, $R^2=0.9972$) siendo reportados los resultados como miligramos equivalentes de verbascósido por gramo de extracto (mg EV/g). El reactivo consistió en preparar previamente ácido clorhídrico 0.5 M, nitrito de sodio al 10% (p/v) y molibdato de sodio al 10% (p/v) en agua destilada y posteriormente se mezclaron en una proporción 4:1:4. Se mezclaron 0.6 mL del reactivo con 0.3 mL de extracto, estándar o disolvente, se dejó reposar por 5 min, posteriormente se agregaron 0.6 mL de hidróxido de sodio 2 N y 1.5 mL de agua destilada, se mezcló e incubó durante 30 min en oscuridad y se leyó la absorbancia a 520 nm.

Con respecto a la cuantificación de lactonas sesquiterpénicas totales (LST) se utilizó el método propuesto por Salapovic *et al.* (2013) usando partenólida como estándar de referencia a concentraciones de 4.96 a 19.86 $\mu\text{g/mL}$ ($y=-0.0008x+0.1743$, $R^2=0.9757$);

se reportan los resultados como miligramos equivalentes de partenólida por gramo de extracto (mg PTN/g). Se leyó la absorbancia a 412 nm.

Se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de los extractos con el radical DPPH. Se preparó el radical DPPH a 0.1 mM disuelto en metanol. Como control positivo se utilizó Trolox 3.9 mM (disuelto en metanol) a concentraciones de 20 a 200 μ M. Como control negativo se empleó metanol. Se secaron 10 ml del extracto para preparar soluciones a diferentes concentraciones para encontrar la IC_{50} . Se mezclaron 1.8 mL de DPPH con 0.3 mL de extracto, trolox o disolvente, se dejó incubar por 15 min en oscuridad y se leyó la absorbancia a 515 nm.

6.1.1.7 Proliferación de biomasa por medio de subcultivos

Se cultivaron células en suspensión durante 30 d en matraces de 1000 mL con 200 mL de medio de cultivo y 12 g de biomasa inicial y se cosecharon a través de filtración al vacío (Figura 10), posteriormente se secaron en una estufa durante 2 días a 60 °C hasta tener la suficiente biomasa para obtener el extracto metanólico y su fraccionamiento.



Fig. 10. Línea celular proliferada para la realización de extractos.

6.1.2 Cultivo de raíces en suspensión de *Tanacetum parthenium* (CRSTp)

El medio de cultivo consistió en medio MS al 50% con 40 g/L de glucosa, 150 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico suplementado con 3 mg/L del regulador de crecimiento vegetal (RCV) ácido naftalenacético (ANA) (Nieto-Trujillo *et al.*, 2017). Se empleó agua destilada para la preparación del medio de cultivo. El medio de cultivo se ajustó a un pH de 5.7-5.8 y se esterilizó en una autoclave a 121 °C por 18 min. El inóculo de raíz, con un peso de 12 g, se propagó en matraces Erlenmeyer de 1000 mL conteniendo 200 mL de medio de cultivo (Nieto-Trujillo *et al.*, 2017) (Fig. 11). Las condiciones de incubación consistieron en colocar los matraces inoculados en un agitador orbital a 110 rpm bajo un fotoperiodo de 16 h luz fluorescente blanca ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 32 días para la generación de biomasa. La biomasa cosechada se filtró con una bomba al vacío, se enjuagó con agua destilada y se puso a secar en una estufa durante 24 h a 45 °C (Fig. 10b).

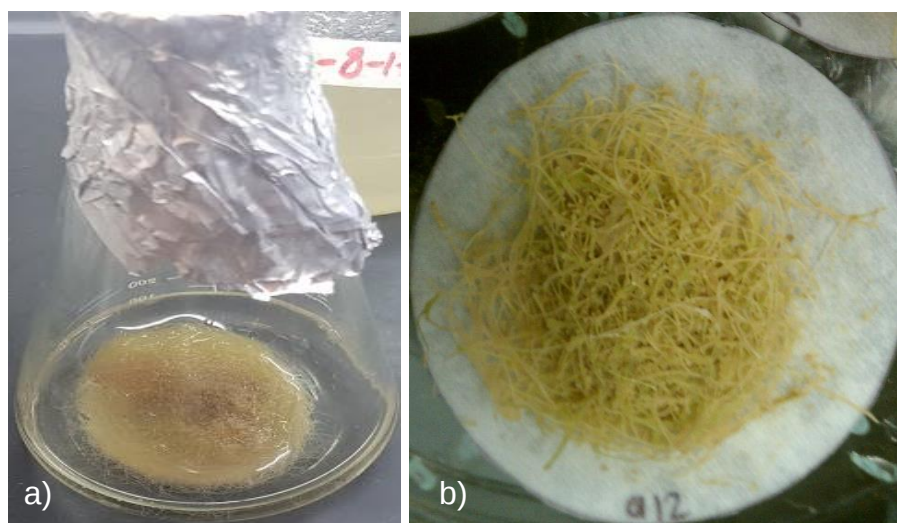


Fig. 11. Cultivos *in vitro* de *T. parthenium*: a) CRSTp y b) biomasa de raíces para la extracción.

6.1.3 Cultivo de células en suspensión de *Buddleja cordata* (CCSBc)

El medio de cultivo consistió en medio MS al 50% con 30 g/L de sacarosa, 150 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico suplementado con 0.1 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 0.5 mg/L de cinetina (Kin) (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2009). Se empleó agua destilada para la preparación del medio de cultivo. El medio

de cultivo se ajustó a un pH de 5.7-5.8 y se esterilizó en una autoclave a 121 °C por 18 min. Se inocularon 12 g de células en matraces Erlenmeyer de 1000 mL conteniendo 200 mL de medio de cultivo. Las condiciones de incubación consistieron en colocar los matraces inoculados en un agitador orbital a 110 rpm bajo un fotoperiodo de 16 h luz fluorescente blanca ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 15 d para la generación de biomasa. La biomasa cosechada se filtró con una bomba al vacío, se enjuagó con agua destilada y se puso a secar en una estufa durante 24 h a 45 °C (Fig. 12).

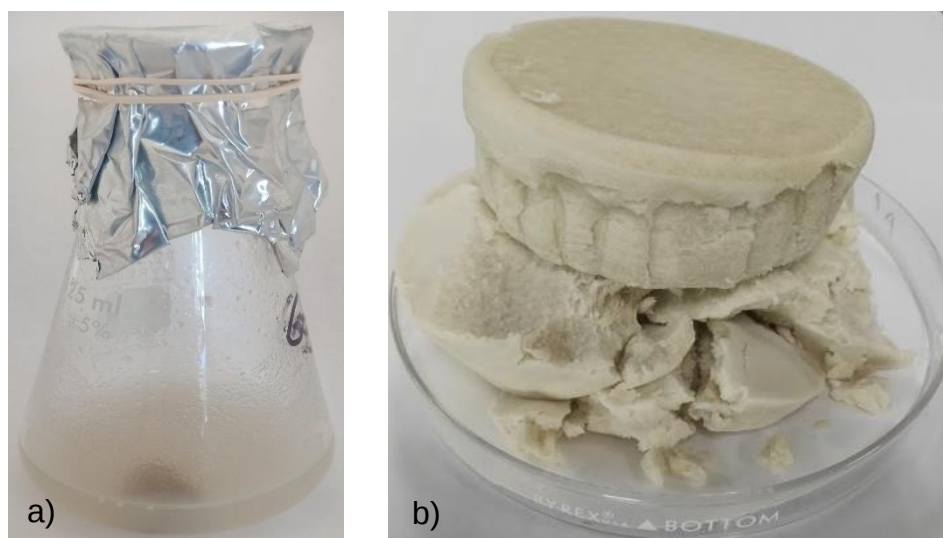


Fig. 12. Cultivo *in vitro* de *B. cordata*: a) CCSBc y b) células proliferadas para la obtención del extracto.

6.2 Extracción metanólica de la biomasa proliferada de los cultivos *in vitro*

Se realizaron extractos (500 mL de metanol por cada 3 g de biomasa seca) de los cultivos de CCSAm, CCSBc y CRSTp previamente secados y pulverizados, con un ultrasonificador como se reporta en la sección 6.1.1.6.

6.2.1 Fraccionamiento de los extractos

Para cada cultivo *in vitro* (CCSAm, CRSTp y CCSBc) se obtuvieron 13 fracciones en total, con un volumen de 100 mL cada una. El fraccionamiento se realizó por medio de cromatografía en columna usando hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetonitrilo, metanol y agua, con polaridad creciente, empleando como fase estacionaria silica gel

con tamaño de malla de 60-200 (Fig. 13). Las fracciones se concentraron en un rotavapor y se llevaron a la sequedad total en una estufa a 60 °C durante 24 h, las fracciones secas se almacenaron en refrigeración para ser empleadas para su análisis fitoquímico y bioensayos de citotoxicidad.



Fig. 13. Columna empleada para el fraccionamiento de los extractos metanólicos de los tres cultivos *in vitro*.

6.2.2 Análisis fitoquímico cualitativo

Se realizaron las pruebas cualitativas de Baljet, cloruro férrico e hidróxido de potasio (Domínguez 1988), para determinar la presencia de lactonas sesquiterpénicas (LS), compuestos fenólicos (CF) y flavonoides (Fv), respectivamente (Fig. 14) en las diferentes fracciones obtenidas, y así seleccionar a aquellas fracciones que al tener mayor respuesta se les realizaría el análisis cuantitativo.

6.2.3 Análisis fitoquímico cuantitativo

Se realizó el mismo procedimiento indicado en la sección 6.1.1.6

Las fracciones a las que se les determinaron el contenido total de compuestos fenólicos y lactonas sesquiterpénicas se emplearon para las pruebas de actividad citotóxica.

6.2.4 Actividad antioxidante (AA)

Se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de las fracciones con el radical DPPH. Se preparó el radical DPPH a 0.1 mM disuelto en metanol. Como control positivo se utilizó Trolox 3.9 mM, se disolvió en metanol y se realizó una curva de calibración a una concentración de 20 a 200 μ M. Como control negativo se empleó metanol. Se tomó 10 mL de las fracciones se llevaron a sequedad total, se determinó el peso seco y posteriormente se disolvieron con 500 μ L de metanol y se realizaron diluciones seriadas para encontrar la IC_{50} .

La reacción consistió en mezclar 1800 μ L del radical DPPH con 300 μ L de muestra, se dejó reposar durante 15 min en oscuridad y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 515 nm. La prueba se realizó por triplicado.

6.2.5 Barrido espectrofotométrico de las fracciones

Se realizó un barrido de absorción a la longitud de onda de 200-900 nm en todas las fracciones para corroborar las diferencias en la absorbancia de sus espectros entre una y otra, y para que al realizar nuevos extractos y fracciones coincidieran en los espectros obtenidos inicialmente.

6.3 Actividad biológica de las fracciones

6.3.1 Cultivo de la línea celular de Linfoma de Burkitt (Linfoma no Hodgkin)

La línea celular Ramos de Linfoma no Hodgkin (Burkitt) humano, fue obtenida de la American Type Cell Collection (ATCC, CRL-1596), y se cultivaron en medio RPMI 1640 Advanced (Invitrogen), suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB, Invitrogen), y 1% de antibióticos- antimicóticos conteniendo 10000 U/mL de penicilina G, 10 mg/mL de estreptomina y 25 μ g/mL anfotericina B. Los cultivos se mantuvieron todo el tiempo a 37°C y 5% de CO_2 . Para los ensayos de viabilidad y apoptosis los cultivos fueron suplementados con SFB al 2%. La línea fue empleada para los experimentos durante un mes después de ser descongelada, posterior a ese tiempo se desechó la línea celular y se descongelaron nuevas células para evitar posibles cambios genéticos y morfológicos.

6.3.2 Viabilidad celular por medio de la tinción de azul de tripán

Se empleó el método de tinción por exclusión usando azul de tripán, que permite diferenciar las células vivas de las muertas, ya que las células vivas cuentan con la membrana celular intacta que es selectiva a los compuestos que deja pasar al interior de las células, en las células viables el azul de tripán no es absorbido, sin embargo atraviesa la membrana de las células muertas mostrando un distintivo color azul bajo el microscopio permitiendo así, hacer el conteo celular en la cámara de Neubauer.

Se realizó una curva dosis respuesta de la vincristina, el cual es un fármaco empleado en el tratamiento del linfoma. También se realizó una curva dosis respuesta del disolvente DMSO empleado para solubilizar las fracciones de los extractos de los cultivos *in vitro*, para determinar si afectaba o no la viabilidad celular.

Se cultivaron 50,000 células por pozo en placas de 96 pozos con medio Advanced-RPMI 1640 suplementado con 2% de suero fetal de bovino. Se colocó como control negativo células sin tratamiento; como control positivo se usó vincristina 1nM (0.000824 µg/mL), y los tratamientos consistieron de las fracciones a concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30 y 40 µg/mL previamente disueltas en DMSO a 24 h, solas y en combinación con vincristina 1 nM a 6 h de exposición para determinar su posible efecto sinérgico, todo por triplicado con 3 repeticiones; las placas se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. El volumen de células empleado fue de 50 µL, el resto fue medio de cultivo y los tratamientos, teniendo como volumen final por pozo 100 µL.

Para el conteo de las células posterior a los tratamientos se tomaron 20 µL de cada pozo, previamente resuspendido, y se mezclaron con 80 µL de azul de tripán, luego se colocaron 10 µL en cada lado de una Cámara de Neubauer y se procedió a contar las células viables en un microscopio invertido con objetivo 40x.

6.4 Análisis estadístico

Las diferencias significativas de las medias de todos los tratamientos fueron determinadas usando un ANOVA, seguida por una prueba de Tukey a través del

software NCSS (versión 2007). Valores de $p < 0.001$ fueron considerados significativos para la actividad citotóxica y una $p < 0.05$ para los demás experimentos.

7 RESULTADOS

7.1 Establecimiento del CCSAm

7.1.1 Asepsia de semillas, germinación y barrido hormonal

Con las condiciones del tren de lavado se logró tener un 100% de asepsia del total de semillas tratadas. Se consiguió un 85% de germinación de las semillas, entre los 4 y 8 días a partir de la siembra (Fig. 15).



Fig. 14. Plántula de *A. montana* cultivada *in vitro* a 3 semanas de su germinación.

Al realizar el barrido hormonal se pudo determinar el efecto de los reguladores del crecimiento vegetal en la inducción de diferentes respuestas morfogénicas en los explantes foliares de *A. montana* a 30 días (Tabla 2). Las respuestas a los tratamientos iniciaron a los 6 días de exposición de las combinaciones de auxinas con citocininas. En algunos tratamientos hubo ausencia de respuesta, en cambio en otros se formaron

raíces de lento crecimiento (solo rizogénesis directa) y de morfologías diversas. En el caso de la formación de callos, la mayoría presentaba lento crecimiento y una morfología compacta, distintas coloraciones, y en algunos casos hubo oxidación. Por lo que, se seleccionaron 3 tratamientos que indujeron callo con las características necesarias para el cultivo en suspensión, que corresponden a las siguientes combinaciones de RCV: 0.5 mg/L de AIB + 1 mg/L de BAP (IB_{0.5}B₁), 1 mg/L de Pic + 0.5 mg/L de Kin (P₁K_{0.5}) y 1mg/L de Pic + 1 mg/L de BAP (P₁B₁). Estos tratamientos presentaron un mejor crecimiento y fueron cultivados en medio líquido en matraces para determinar que tanto se disgregaban para establecer el cultivo en suspensión (Fig. 15). De los tres tratamientos finales el que tuvo mejor respuesta en el medio líquido fue el P₁K_{0.5} y con el que se decidió continuar trabajando. Después de 6 subcultivos, las células en suspensión no presentaron cambios respecto a una coloración amarillo pálido, rápido crecimiento y una disgregación celular completa, por lo que la consideramos como una línea celular estable.

Tabla 2. Porcentaje de respuesta morfogenética inducida en explantes foliares de *A. montana* a tratamientos con reguladores del crecimiento vegetal, después de 30 días de cultivo.

Código del tratamiento	RCV (mg/L)				% de respuesta inducida	
	Auxina		Citocinina		Callo	Raíz
D _{0.5} K _{0.5}	2,4-D	0.5	Kin	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D ₁ K _{0.5}		1.0		0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D _{0.5} K ₁		0.5		1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D ₁ K ₁		1.0		1.0	100 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D _{2.5} K _{2.5}		2.5		2.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D ₅ K ₅		5.0		5.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D _{0.5} B _{0.5}	2,4-D	0.5	BAP	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D ₁ B _{0.5}		1.0		0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D _{0.5} B ₁		0.5		1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D ₁ B ₁		1.0		1.0	100 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D _{2.5} B _{2.5}		2.5		2.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
D ₅ B ₅		5.0		5.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A _{0.5} K _{0.5}	ANA	0.5	Kin	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A ₁ K _{0.5}		1.0		0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A _{0.5} K ₁		0.5		1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A ₁ K ₁		1.0		1.0	0.0 ± 0.0	50 ± 0.5
A _{2.5} K _{2.5}		2.5		2.5	0.0 ± 0.0	50 ± 0.5
A ₅ K ₅		5.0		5.0	0.0 ± 0.0	50 ± 0.5
A _{0.5} B _{0.5}	ANA	0.5	BAP	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A ₁ B _{0.5}		1.0		0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A _{0.5} B ₁		0.5		1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A ₁ B ₁		1.0		1.0	50 ± 0.5	50 ± 0.5
A _{2.5} B _{2.5}		2.5		2.5	25 ± 0.2	75 ± 0.7
A ₅ B ₅		5.0		5.0	50 ± 0.5	25 ± 0.2
IA _{0.5} K _{0.5}	AIA	0.5	Kin	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IA ₁ K _{0.5}		1.0		0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IA _{0.5} K ₁		0.5		1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IA ₁ K ₁		1.0		1.0	25 ± 0.2	25 ± 0.2

IA _{2.5} K _{2.5}		2.5		2.5	0.0 ± 0.0	25 ± 0.2
IA ₅ K ₅		5.0		5.0	0.0 ± 0.0	75 ± 0.7
IA _{0.5} B _{0.5}	AIA	0.5	BAP	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IA ₁ B _{0.5}		1.0		0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IA _{0.5} B ₁		0.5		1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IA ₁ B ₁		1.0		1.0	25 ± 0.2	25 ± 0.2
IA _{2.5} B _{2.5}		2.5		2.5	50 ± 0.5	0.0 ± 0.0
IA ₅ B ₅		5.0		5.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IB _{0.5} K _{0.5}	AIB	0.5	Kin	0.5	50 ± 0.5	50 ± 0.5
IB ₁ K _{0.5}		1.0		0.5	0.0 ± 0.0	100 ± 0.0
IB _{0.5} K ₁		0.5		1.0	0.0 ± 0.0	100 ± 0.0
IB ₁ K ₁		1.0		1.0	0.0 ± 0.0	100 ± 0.0
IB _{2.5} K _{2.5}		2.5		2.5	0.0 ± 0.0	100 ± 0.0
IB ₅ K ₅		5.0		5.0	25 ± 0.2	25 ± 0.2
IB _{0.5} B _{0.5}	AIB	0.5	BAP	0.5	0 ± 0.0	100 ± 0.0
IB ₁ B _{0.5}		1.0		0.5	75 ± 0.7	25 ± 0.2
IB_{0.5}B₁		0.5		1.0	100 ± 0.0	0 ± 0.0
IB ₁ B ₁		1.0		1.0	25 ± 0.2	25 ± 0.2
IB _{2.5} B _{2.5}		2.5		2.5	0 ± 0.0	0 ± 0.0
IB ₅ B ₅		5.0		5.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
P _{0.5} K _{0.5}	Pic	0.5	Kin	0.5	100 ± 0.0	0 ± 0.0
P₁K_{0.5}		1.0		0.5	100 ± 0.0	0 ± 0.0
P _{0.5} K ₁		0.5		1.0	100 ± 0.0	0 ± 0.0
P ₁ K ₁		1.0		1.0	75 ± 0.7	0 ± 0.0
P _{2.5} K _{2.5}		2.5		2.5	25 ± 0.2	0 ± 0.0
P ₅ K ₅		5.0		5.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
P _{0.5} B _{0.5}	Pic	0.5	BAP	0.5	100 ± 0.0	0 ± 0.0
P ₁ B _{0.5}		1.0		0.5	100 ± 0.0	0 ± 0.0
P _{0.5} B ₁		0.5		1.0	100 ± 0.0	0 ± 0.0
P₁B₁		1.0		1.0	100 ± 0.0	0 ± 0.0
P _{2.5} B _{2.5}		2.5		2.5	50 ± 0.5	0 ± 0.0
P ₅ B ₅		5.0		5.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0

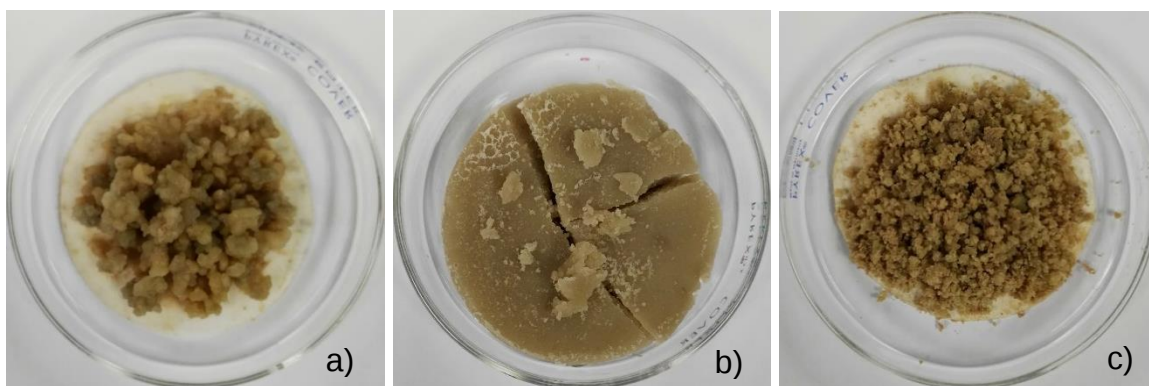


Fig. 15. Características fenotípicas de callos de *A. montana* cultivados en suspensión a 15 días, a) IB_{0.5}B₁ formando agregados celulares grandes y heterogéneos, b) P₁K_{0.5} completamente disagregada y de rápido crecimiento y c) P₁B₁ una mezcla de células disagregadas y agregados celulares pequeños y homogéneos.

7.1.2 Caracterización de los parámetros cinéticos de crecimiento del CCSAm

La línea celular P₁K_{0.5} presentó 3 fases del crecimiento, una fase de adaptación que duró de los 0 a los 3 días de cultivo, seguida de la fase exponencial que duró de los 3 a los 15 días, posteriormente una fase estacionaria de los 15 a los 30 días (Figura 15). Los parámetros de crecimiento que se determinaron fueron: un tiempo de duplicación (td) de la biomasa de 4.06 d, una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.1706 d y una biomasa máxima de 8.9 g/L al día 15.

Además, al realizar el ensayo de azúcares reductores en el medio de cultivo se pudo encontrar que al día 30 de la cinética de crecimiento, el consumo de glucosa había sido casi total (Fig. 17). La línea celular presenta un crecimiento rápido y un eficiente consumo de la fuente de carbono.

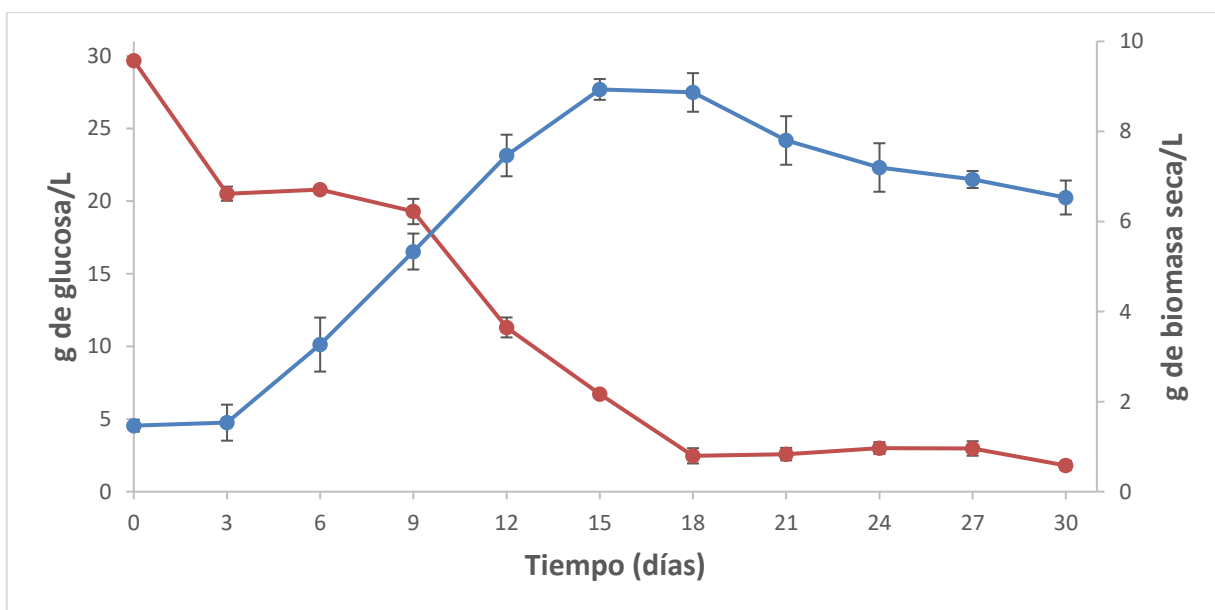


Fig. 16. Caracterización del crecimiento celular del CCSAm y consumo de la fuente de carbono durante 30 días

7.1.3 Perfil fitoquímico en el tiempo

Se determinó que al día 15 del cultivo se logró producir una mayor cantidad de biomasa, mientras que la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, glucósidos fenilpropanoides totales y lactonas sesquiterpénicas totales se obtuvieron al día 30 del cultivo (Fig. 18). Lo anterior se vio reflejado en la actividad

antioxidante de dicho extracto, el cual fue mayor al día 30. A partir de estos resultados, se decidió proliferar la línea celular de *A. montana* durante 30 días para la generación de biomasa y obtener el extracto metanólico que fue sujeto a fraccionamiento.

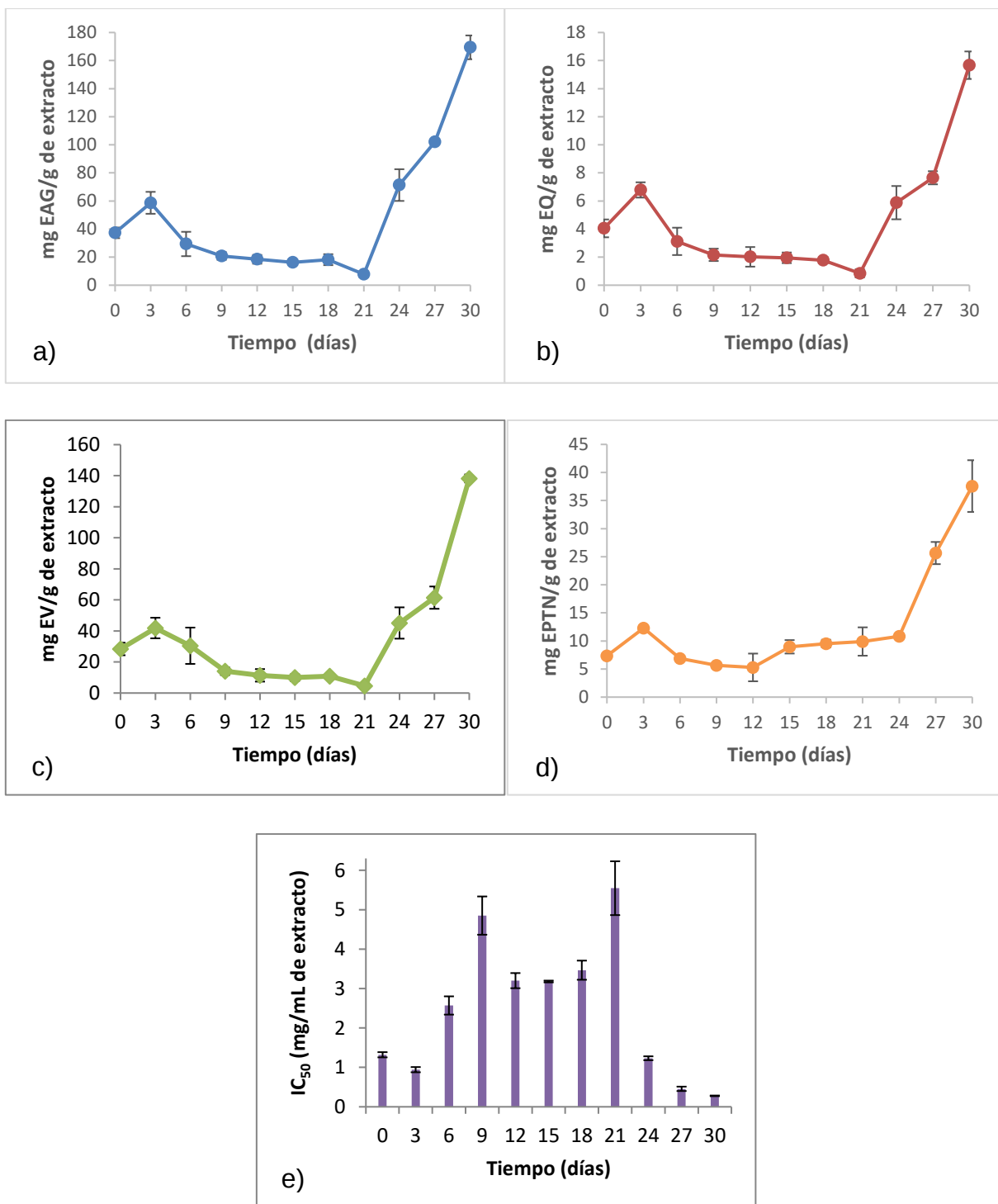


Fig. 17. Análisis fitoquímico sobre los metabolitos secundarios contenidos en el extracto metanólico obtenido de la línea celular P₁K_{0.5}, durante 30 días de cultivo. a) contenido de CFT, b) contenido de FvT, c) contenido de GFPT, d) contenido de LST y e) actividad antioxidante

7.2 Perfil fitoquímico de las fracciones de los cultivos *in vitro*

7.2.1 Análisis fitoquímico cualitativo

La cromatografía en columna produjo fracciones mostrando diferente perfil fitoquímico con base al análisis cualitativo de CF, Fv y LS presentes en los cultivos CCSAm, CRSTp y CCSBc (Fig. 19).

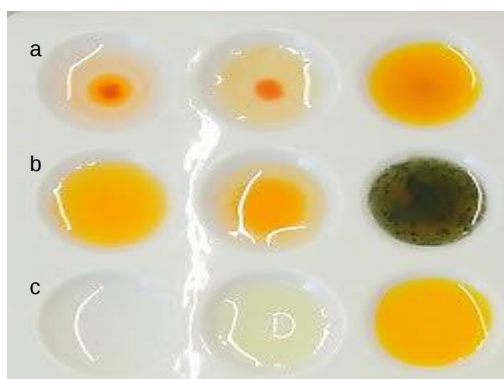


Fig. 18. Análisis fitoquímico de fracciones, los primeros 3 pozos de la primera columna se empleó disolvente como control negativo, la columna 2 y 3 corresponden a dos fracciones diferentes. a) prueba de Baljet, en el tercer pozo se observa una coloración entre amarilla y anaranjada que se toma como positiva, b) prueba de cloruro férrico, en el tercer pozo se da una coloración entre negra, verde o azul que se toma como positiva y c) prueba de hidróxido de potasio, en el tercer pozo hay una coloración amarilla oscura que se toma como positiva. A mayor intensidad de la coloración se espera que contenga una mayor concentración de metabolitos secundarios.

Se eligieron para continuar trabajando las fracciones F4, F5 y F6 del CCSAm; F4, F5, F8 y F13 del CRSTp y F3, F4 y F5 del CCSBc (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis cualitativo de compuestos fenólicos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas por ensayos colorimétricos de las fracciones de los 3 cultivos en suspensión.

Fracción	CCSAm			CRSTp			CCSBc		
	CF	Fv	LS	CF	Fv	LS	CF	Fv	LS
F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	+	-	+	-	-	-
F3	+	-	-	+	+	+	+++	+++	+++
F4	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
F5	+	+++	+	++	++	++	++	-	+

F6	+	++	+	+	+	+	-	-	+
F7	-	-	-	+	+	+	-	-	-
F8	-	-	-	+	+	++	-	-	-
F9	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F10	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F11	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F12	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F13	-	-	-	-	++	+	-	-	-

Los símbolos – / + indican la ausencia o presencia de reacción, respectivamente; en el caso de presencia se usó de 1 a 3 veces el símbolo + para señalar la intensidad de menor a mayor la reacción colorimétrica.

7.2.2 Análisis fitoquímico cuantitativo

Las fracciones que cualitativamente mostraron mayor contenido de LS y CF, también mostraron diferencias en el contenido de CFT, FvT, GFPT y LST (Tabla 4). La cantidad máxima de compuesto fenólicos totales obtenida fue de 270.2 mg EAG/g de extracto en la fracción 5 de *A. montana*, seguida de la fracción 4 de *T. parthenium* con 194.15 y por último la fracción 4 de *B. cordata* con 18.26; para los flavonoides totales se consiguió 201.05 mg EQ/g de extracto en la fracción 5 de *A. motana*, seguida de la fracción 13 de *T. parthenium* con 16.53 y por último la fracción 5 de *B. cordata* con 0.31; en el caso de los feniletanolglucósidos totales la mayor producción se dio en la fracción 4 de *T. parthenium* con 143.56 mg EV/g de extracto, seguida de la fracción 5 de *A. montana* con 83.31 y por último la fracción 4 de *B. cordata* con 11.15; para el caso de las lactonas sesquiterpénicas totales la mayor concentración fue de 14.84 mg EP/g de extracto para la fracción 4 de *T. parthenium*, seguida de la fracción 5 de *A. montana* con 5.43 y por último la fracción 4 de *B. cordata* con 0.12. Las fracciones de *B. cordata* presentan una mayor actividad antioxidante, seguidas de las de *A. montana* y por último las fracciones de *T. parthenium*. En el caso de la F3 del CCSBc a partir de aquí no se presentan sus resultados debido a la protección de datos para la realización de una patente.

Tabla 4. Análisis fitoquímico cuantitativo de CFT, FvT, GFPT y LST y AA de fracciones obtenidas de los cultivos en suspensión de las 3 especies vegetales.

Fracción	Contenido de compuestos totales				Actividad antioxidante
	CFT	FvT	GFPT	LST	IC ₅₀ (µg/mL)

	mg EAG/g	mg EQ/g	mg EV/g	mg EP/g	
F4-CCSAm	28.07 ± 1.86 _a	9.98 ± 0.14 _{abcde}	26.51 ± 0.19 _a	29.39 ± 1.12 _a	2.20 ± 0.85 _a
F5-CCSAm	270.2 ± 4.84 _c	201.05 ± 3.83 _f	83.31 ± 0.95 _b	325.45 ± 0.19 _b	5.43 ± 0.79 _b
F6-CCSAm	170.16 ± 4.19 _d	188.53 ± 3.92 _g	45.24 ± 0.23 _c	397.75 ± 1.44 _c	3.19 ± 0.86 _c
F4-CRSTp	194.15 ± 2.9 _e	6.43 ± 0.12 _{bc}	143.56 ± 1.9 _d	6.09 ± 0.79 _{def}	14.84 ± 0.83 _d
F5-CRSTp	127.48 ± 4.07 _f	5.6 ± 0.09 _{bc}	58.87 ± 0.07 _e	10.33 ± 1.2 _{defg}	6.11 ± 0.49 _e
F8-CRSTp	107.69 ± 3.12 _g	11.93 ± 0.02 _{abcd}	22.17 ± 0.04 _f	14.72 ± 1.79 _{def}	2.30 ± 0.37 _f
F13-CRSTp	52.8 ± 2.5 _h	16.53 ± 0.04 _{abcd}	46.35 ± 0.06 _g	12.06 ± 2.77 _{egi}	14.78 ± 0.91 _g
F4-CCSBc	18.26 ± 0.01 _{ab}	0.25 ± 0.004 _{abcde}	11.15 ± 0.07 _h	3.83 ± 0.75 _{hi}	0.12 ± 0.001 _h
F5-CCSBc	9.92 ± 0.06 _b	0.31 ± 0.01 _{ade}	8.60 ± 0.03 _i	6.75 ± 0.13 _{ghi}	0.02 ± 0.0003 _f

7.2.3 Barrido espectrofotométrico

Los barridos espectrofotométricos dieron espectrogramas diferentes entre las fracciones obtenidas para cada cultivo *in vitro*, de manera que se pudo comprobar que el fraccionamiento fue satisfactorio desde el punto de vista de separación de componentes de los extractos por la polaridad de los disolventes (Fig. 18-20).

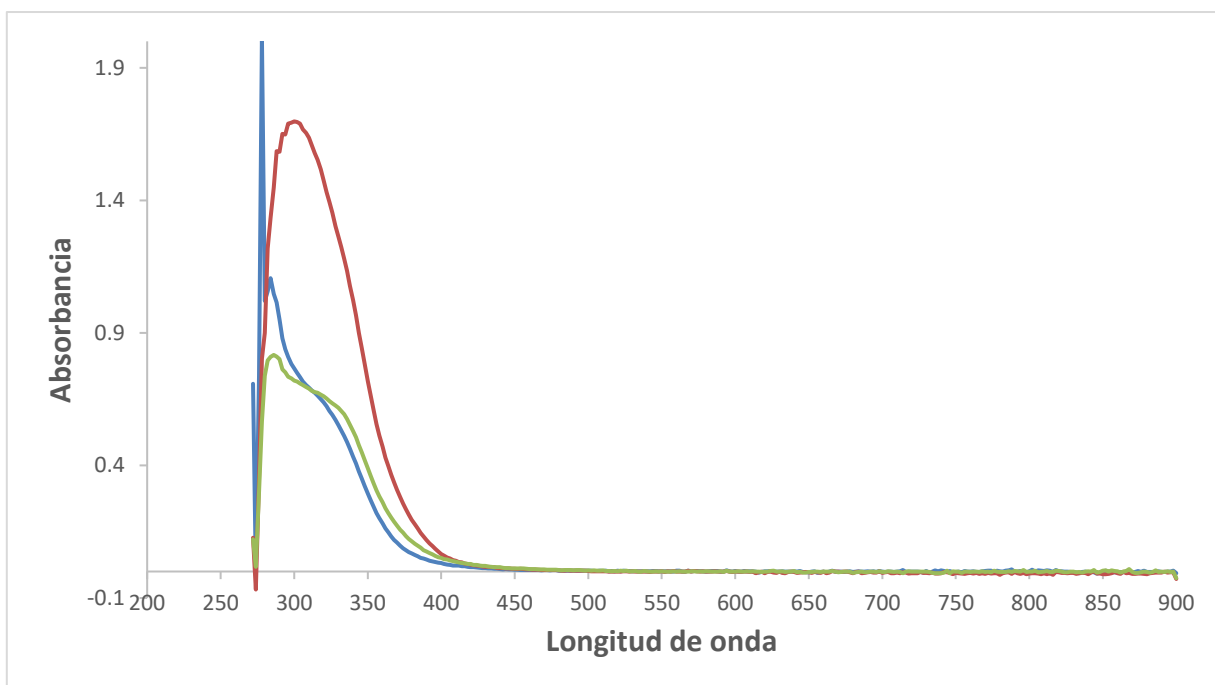


Fig. 19. Espectros de absorción encontrados en las fracciones 4 (azul), 5 (rojo) y 6 (verde) del CCSAm donde se aprecian diferencias en la absorción de la longitud de onda.

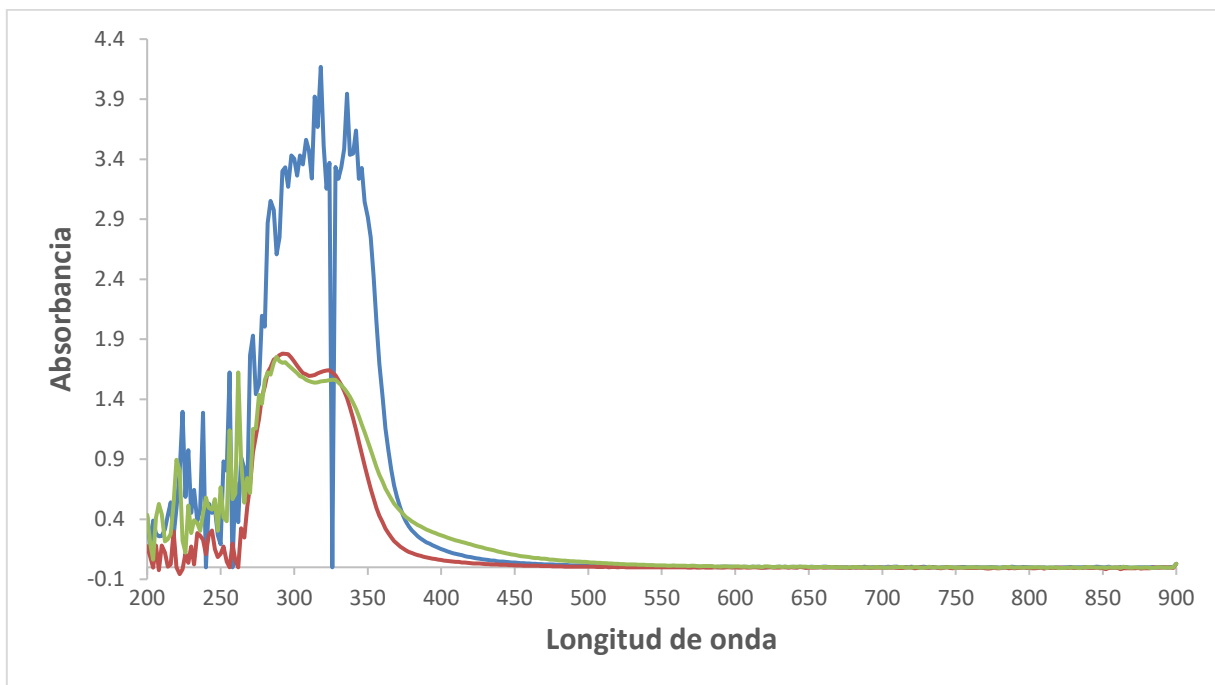


Fig. 20. Espectros de absorción de las fracciones 4 (azul), 5 (rojo) y 8 (verde) del CRSTp donde se aprecian diferencias en la absorción de la longitud de onda

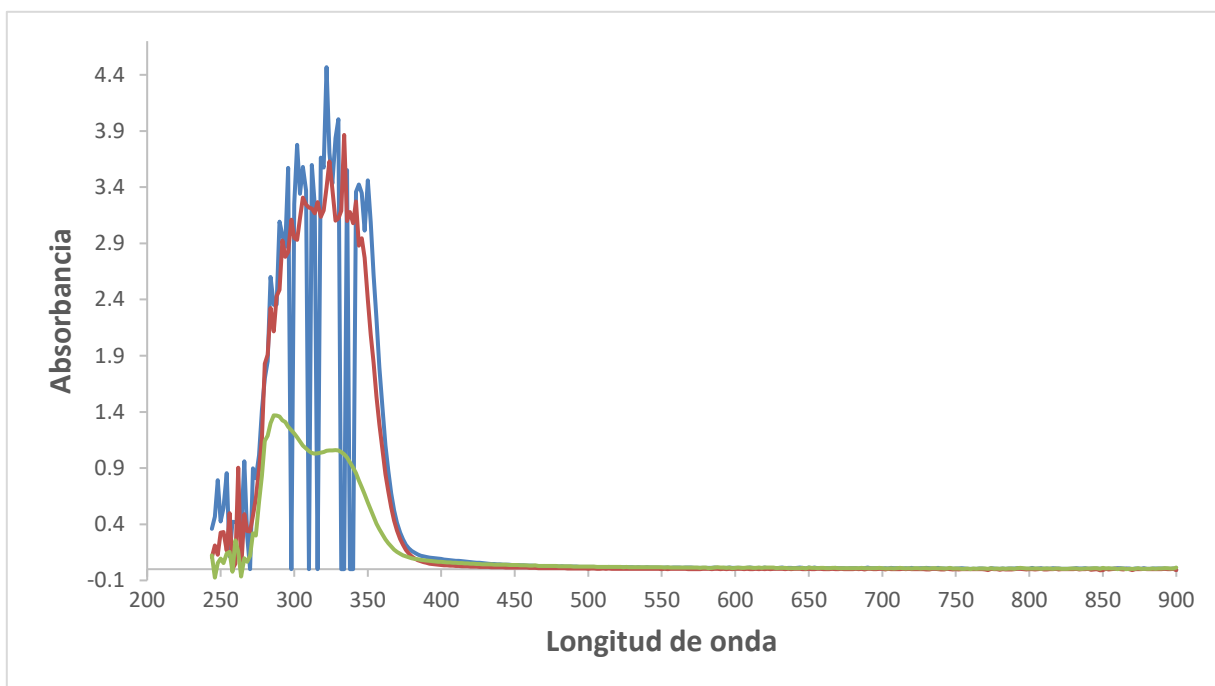
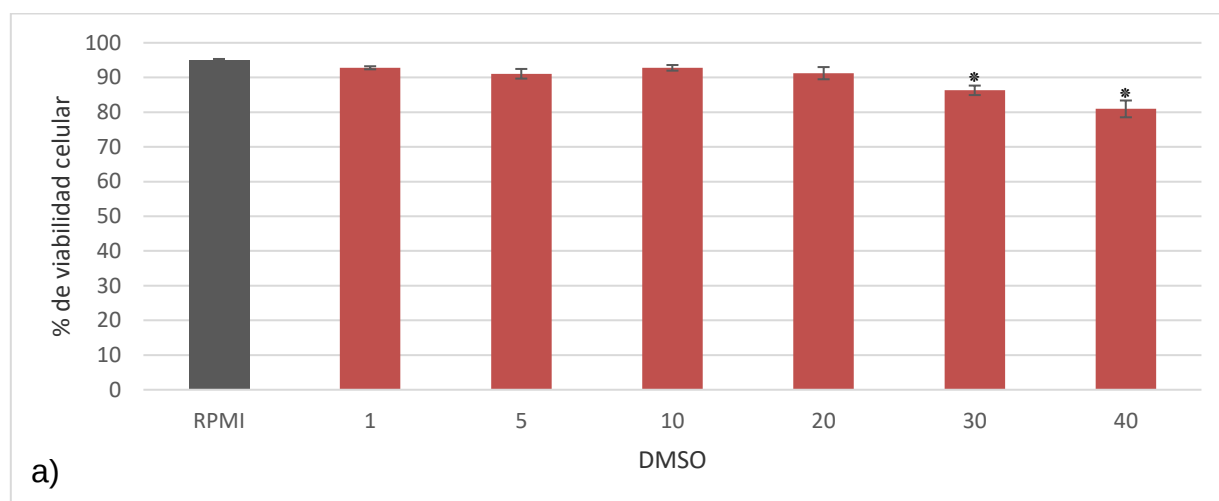


Fig. 21. Espectros de absorción para las fracciones 3 (azul), 4 (rojo) y 5 (verde) del CCSBc donde se aprecian diferencias en la absorción de la longitud de onda.

7.3 Actividad citotóxica de las fracciones

Se determinó la citotoxicidad del DMSO a los volúmenes agregados a los pozos con respecto a las fracciones empleadas, ya que se utilizó éste para solubilizar las fracciones, donde no se observó un efecto significativo sobre la viabilidad celular, por lo tanto, no afecta los resultados de las fracciones sobre la viabilidad celular (Fig. 21a). El tratamiento con el fármaco vincristina provocó la disminución de la viabilidad celular de las células ramos en una respuesta dependiente de la dosis a 6 horas de exposición, siendo las concentraciones de 1 y 2 nM las que dieron un mayor efecto inhibitorio, por lo que se decidió emplear la concentración de 1 nM como control positivo, debido a que con esa concentración se obtiene una reducción del 25% de viabilidad celular y permitió analizar un posible efecto sinérgico de este fármaco al combinarlo con las fracciones de las 3 especies vegetales empleadas (Fig. 21b).



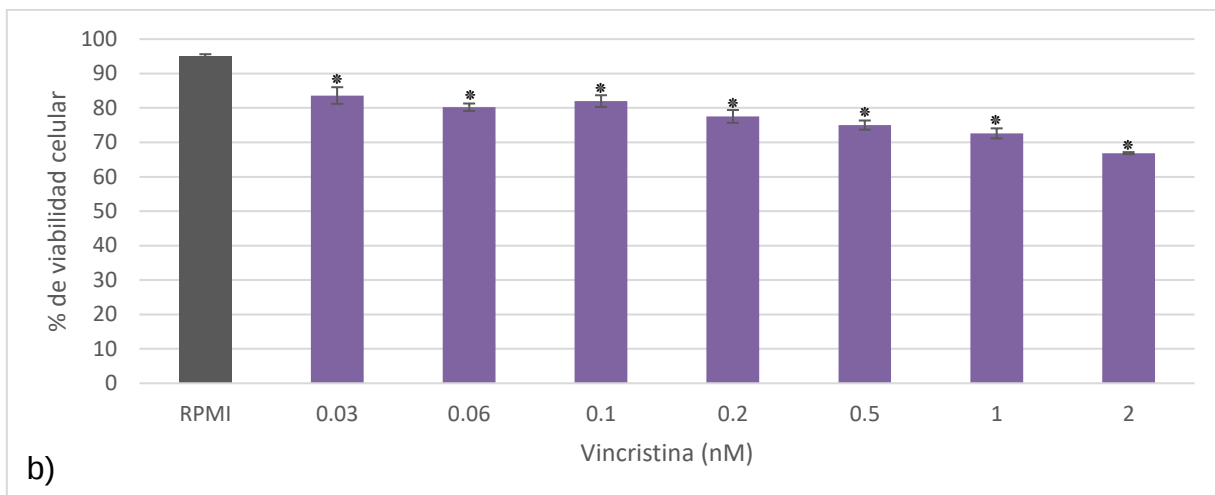


Fig. 22. Efecto de la vincristina y del DMSO a diferentes concentraciones sobre la línea celular ramos. a) curva de DMSO a 24 horas como control de disolvente de las fracciones y b) Efecto de la vincristina a 6 horas de tratamiento. El RPMI representa al control negativo, el cual lleva solo medio de cultivo. * representa los tratamiento que fueron significativos con respecto al control negativo con un valor de $p < 0.001$.

Al realizar los experimentos correspondientes a la actividad citotóxica de las fracciones de *A. montana* se determinó que hubo una mayor disminución de los porcentajes de viabilidad celular en las 3 mayores concentraciones probadas, siendo la de 40 $\mu\text{g/mL}$ la que disminuyó hasta en 30-50% la viabilidad para las 3 fracciones (Fig. 22, barras azules). Al realizar la combinación de las fracciones con vincristina se incrementó el porcentaje de muerte celular respecto al obtenido de la fracción sola, o la vincristina sola, alcanzando una reducción de la viabilidad celular a valores del 10-20% para las F4 y F5, y menos del 10% para la F6 con la que se observa un mejor efecto (Fig. 22, barras verdes). La vincristina sola a 1nM disminuye la viabilidad celular a valores del 75% aproximadamente.

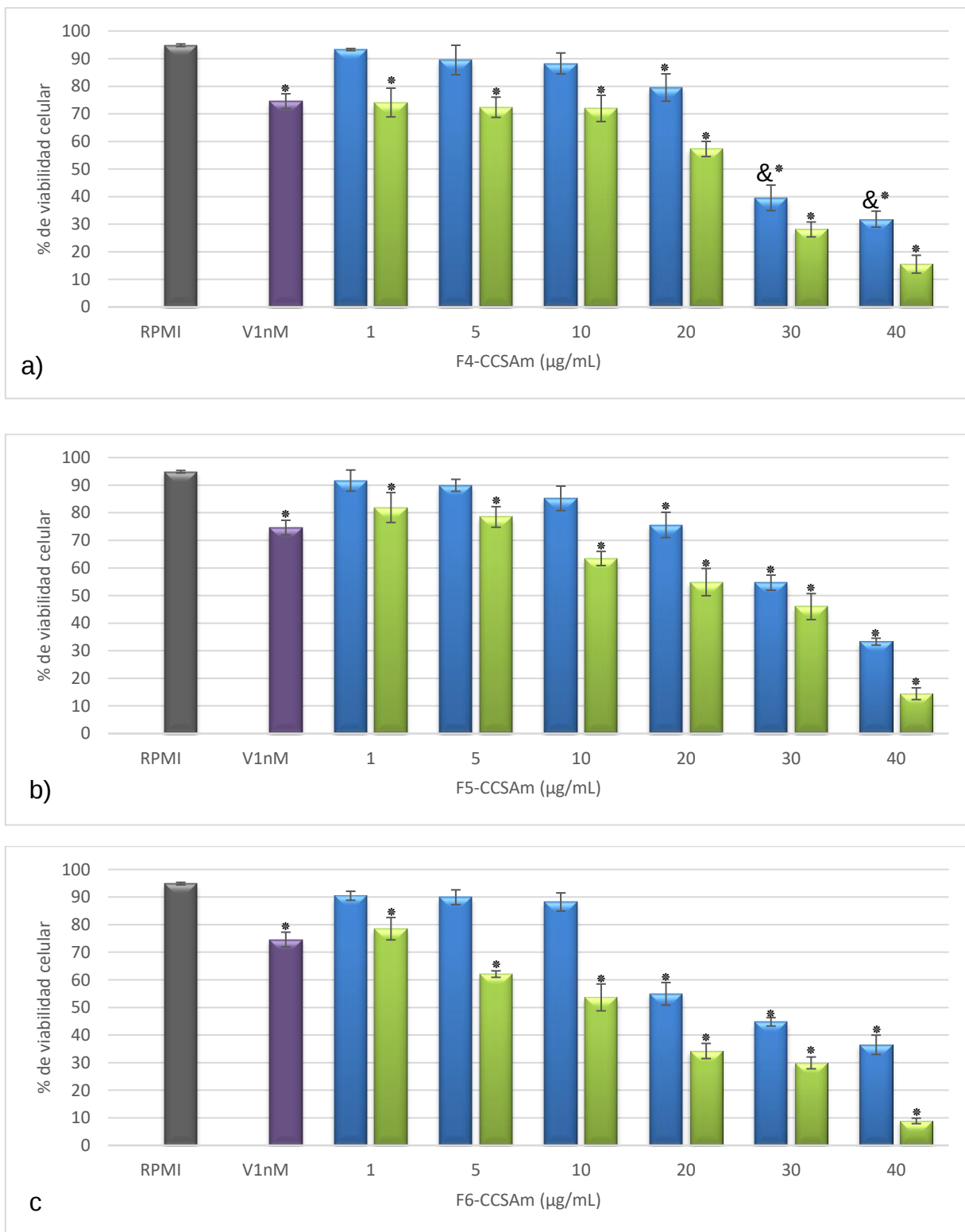
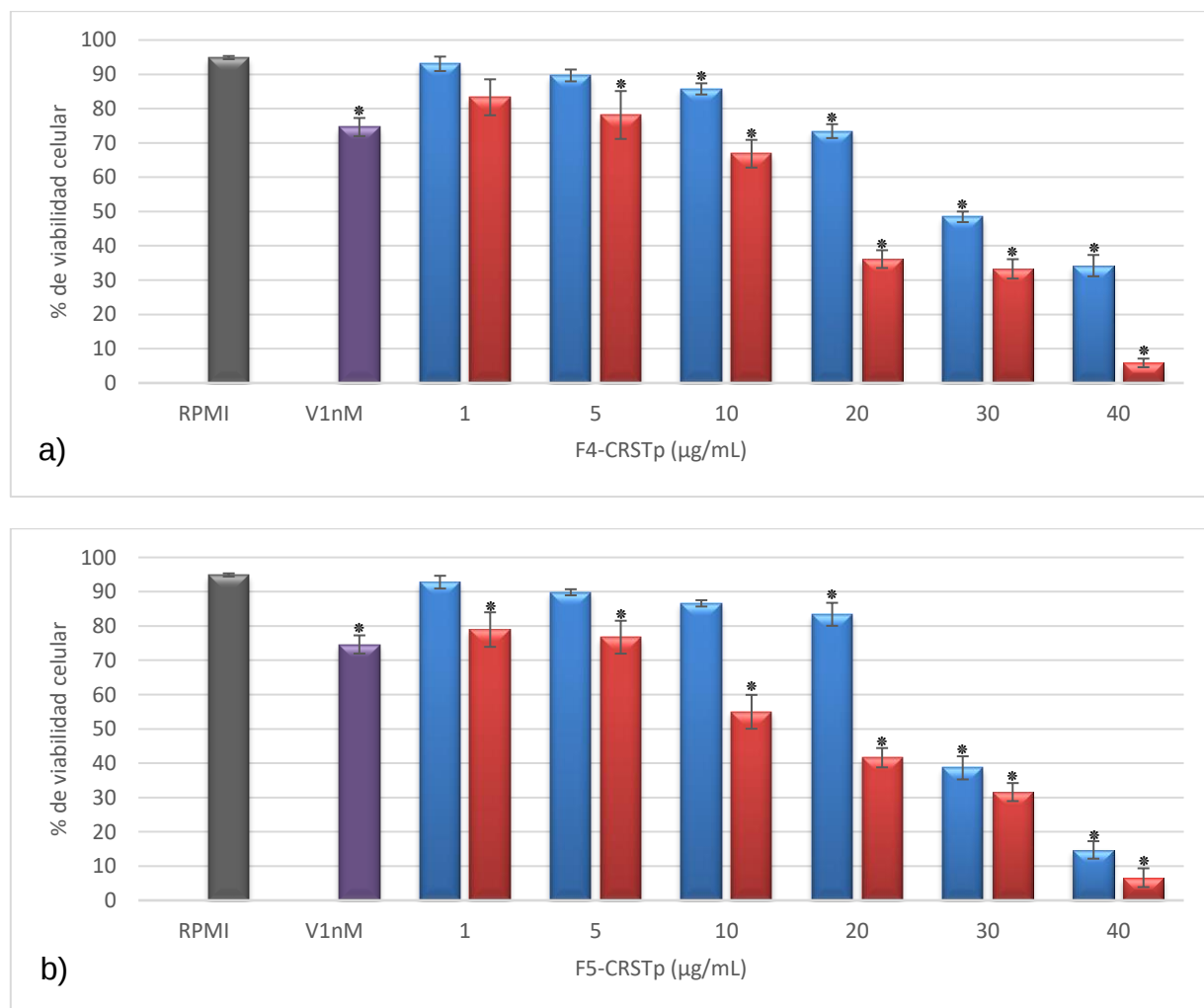


Fig. 23. Fracciones del CCSAm a 24 horas de tratamiento, solas (barras azules) y en combinación con vincristina 1 nM (barras verdes) durante 6 horas: a) fracción 4 (F4), b) fracción 5 (F5) y c) fracción 6

(F6). El RPMI representa al control negativo, el cual lleva solo medio de cultivo. * representa los tratamiento que fueron significativos con respecto al control negativo con un valor de $p < 0.001$.

Para las fracciones de *T. parthenium* las mayores concentraciones probadas disminuyeron la viabilidad celular, siendo la de 40 $\mu\text{g/mL}$ la que mejor funcionó dando como resultado una disminución de la viabilidad celular a valores entre 30-40% para la fracción 4 y entre el 10-20% para las fracciones 5 y 8 (Fig. 23b, c); con la combinación de las fracciones y el extracto se alcanzó disminuir la viabilidad celular a valores del 10% con las fracciones 4 y 5, y entre el 10-20% para la fracción 8, mostrando así un efecto potenciado principalmente con la fracción 4 y la vincristina (Fig. 23a). La fracción 13 no fue estudiada debido al bajo rendimiento durante el fraccionamiento y no se contó con la cantidad necesaria.



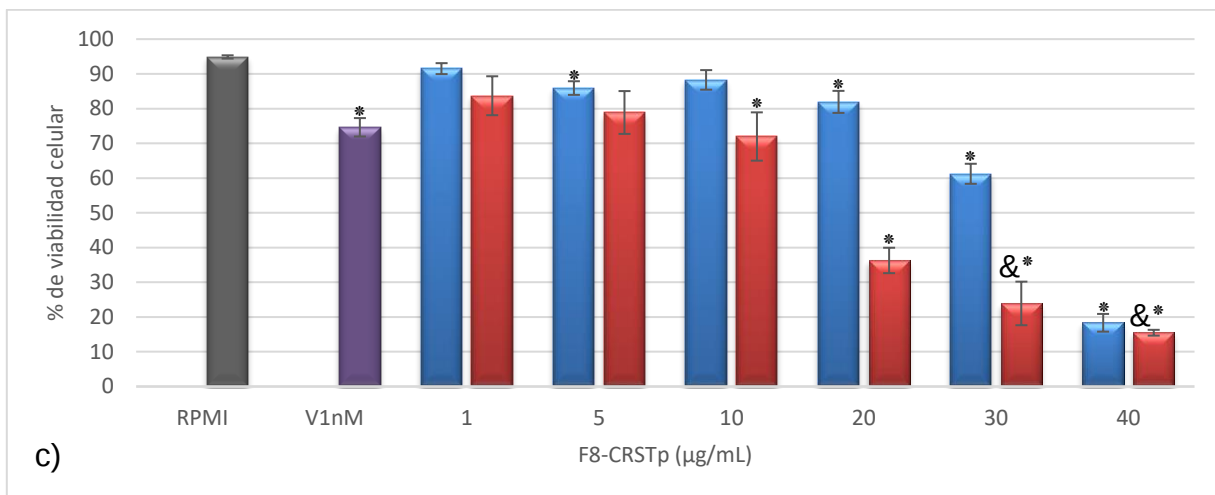
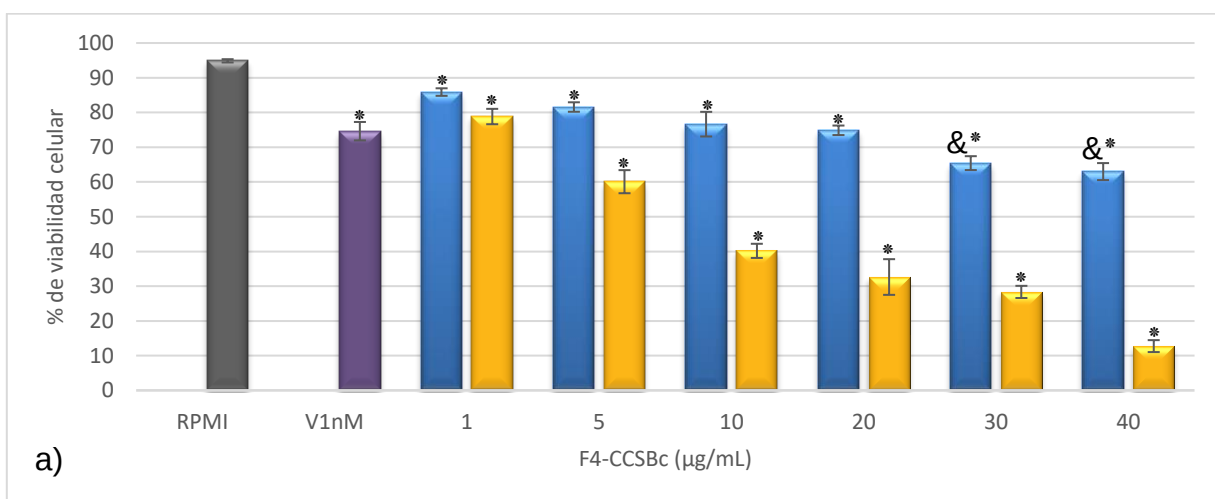


Fig. 24. Fracciones del CRSTp a 24 horas, solas (barras azules) y en combinación con vincristina 1 nM a 6 horas (barras rojas): a) fracción 4 (F4), b) fracción 5 (F5) y c) fracción 8 (F8). El RPMI representa al control negativo, el cual lleva solo medio de cultivo. * representa los tratamiento que fueron significativos con respecto al control negativo con un valor de $p < 0.001$.

Por último, con las fracciones de *B. cordata* hubo efecto de la disminución de la viabilidad celular a partir de la mínima concentración probada, llegando a un porcentaje de viabilidad del 60-70% con la fracción 4 y del 40% con la fracción 5 a los 40 µg/mL (Fig. 24a, b). Con la combinación de las fracciones y vincristina los valores de la viabilidad celular disminuyeron del 10-20% para ambos casos a los 40 µg/mL, mostrando que en la fracción 4 se mejoró su efecto con respecto al resultado obtenido cuando se trataron con la fracción sola (Fig. 24a, b).



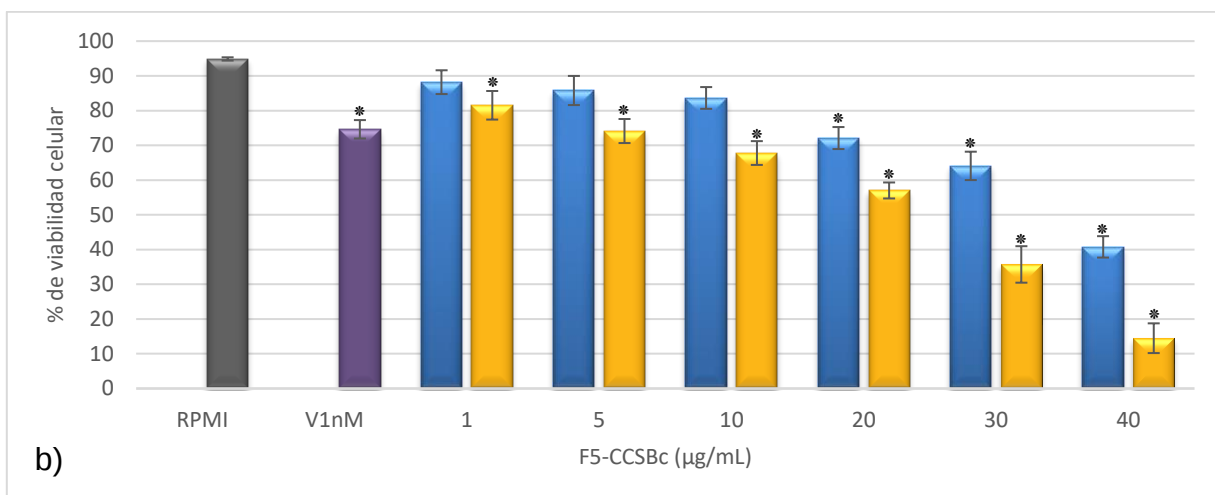


Fig. 25. Fracciones del CCSBc a 24 horas, solas (barras azules) y en combinación con vincristina 1 nM a 6 horas (barras amarillas): a) fracción 4 (F4) y b) fracción 5 (F5). El RPMI representa al control negativo, el cual lleva solo medio de cultivo. * representa los tratamientos que fueron significativos con respecto al control negativo con un valor de $p < 0.001$.

7.3.1 Concentración inhibitoria media (IC_{50})

Al realizar el análisis para determinar el IC_{50} se encontró que para *Arnica montana* la fracción que requiere una concentración menor en combinación con vincristina es la 6, para *Tanacetum parthenium* no hubo diferencias significativas entre las tres fracciones y para *Buddleja cordata* fue la fracción 4 (Tabla 5). Con todas las fracciones a las mayores concentraciones probadas se potenció la actividad citotóxica de la vincristina.

Tabla 5. Concentración requerida de las fracciones a 24 horas, obtenidas de cultivos *in vitro*, solas o combinadas con vincristina adicionada a 6 horas previas al conteo celular para inhibir al 50% la viabilidad celular de la línea RA-1.

Tratamiento	$IC_{50} \pm DE$ ($\mu\text{g/mL}$)
F4-CCSAm	29.47 ± 1.14 acdegik
F4-CCSAm + V	19.62 ± 1.01 bfhjlo
F5-CCSAm	32.15 ± 0.60 acegikñ
F5-CCSAm + V	21.26 ± 0.73 bdehijlo
F6-CCSAm	28.69 ± 1.40 cdegik
F6-CCSAm + V	14.24 ± 1.22 bfhjln
F4-CRSTp	30.91 ± 0.76 acegikñ
F4-CRSTp + V	17.88 ± 1.41 bdfhjln
F5-CRSTp	26.37 ± 1.31 acdegiko
F5-CRSTp + V	16.71 ± 1.26 bdfhjln
F8-CRSTp	30.30 ± 0.94 acegik

F8-CRSTp + V	18.45 ± 1.99 bdfhjlno
F4-CCSBc	60.82 ± 4.93 m
F4-CCSBc + V	12.24 ± 1.62 fhjln
F5-CCSBc	37.19 ± 0.93 cgñ
F5-CCSBc + V	20.71 ± 0.58 bdhijlo

8 DISCUSIÓN.

Arnica montana L. es una planta con importancia económica para numerosos países debido a su uso medicinal en fitoterapia humana/veterinaria y en homeopatía, como materia prima para la elaboración de productos cosméticos y en la fabricación de algunos licores europeos, por lo que se trata de una planta considerada amenazada por su sobreexplotación (Waizel-Bucay & Cruz-Juárez, 2014). Por lo que, en el presente trabajo se estableció un cultivo de células en suspensión de *A. montana* a partir de explantes foliares de plántulas germinadas para la producción de metabolitos secundarios de manera sustentable; con las condiciones empleadas se consiguió un 85% de germinación entre los 4-8 días de siembra en el medio de cultivo MS libre de RCV, que fue mayor a lo reportado por Jurkiewicz y colaboradores (2010) que sembraron semillas en papel filtro húmedo, donde la germinación inició a los 7 días con un 50-70% de germinación a los 14 días; en otro reporte realizado por Panciu y colaboradores (2014) lograron un 47.76% de germinación de semillas luego de 7-14 días de siembra, empleando agua destilada estéril adicionada con 5 mg/L del regulador del crecimiento ácido giberélico, el cual favorece la germinación. Dichas diferencias podrían deberse a la viabilidad de las semillas empleadas para dichos trabajos, y a la diferencia en las condiciones de la germinación.

Se han realizado algunos estudios para establecer cultivos *in vitro* de *A. montana*, obteniéndose diferentes respuestas morfogénéticas que dependen del genotipo, del tipo de explante empleado, de los constituyentes del medio de cultivo y de los reguladores del crecimiento usados (Petrova *et al.*, 2012). Tal es el caso de los trabajos realizados previamente por otros investigadores, como Malarz y colaboradores (1993), que encontraron que el medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa y 0.1 mg/L de 2,4-D promueve la formación de callos a partir de explantes foliares y que a mayor concentración del regulador se disminuye la velocidad de crecimiento de los callos, además de que presentan necrosis; de igual manera, Schmidt y colaboradores (1998) obtuvieron callos a partir de hojas usando MS con 30 g/L de sacarosa con los reguladores del crecimiento AIA a 0.2 mg/L, 2,4-D a 0.1 mg/L y 2 mg/L de Kin; por otro

lado, Petrova y colaboradores (2008) emplearon cotiledones e hipocótilos de plántulas con 15 días después de su germinación y probaron distintos reguladores del crecimiento vegetal en medio MS con 30g/L de sacarosa, las mejores respuestas obtenidas fueron con hipocótilos; las combinaciones que mejor les funcionaron fueron el 2,4-D a 0.1 mg/L + AIA a 0.2 mg/L con un 80% de inducción de callos friables y 0.1 mg/L de 2,4-D + 0.2 mg/L de AIA + 1 mg/L de Kin con un 93.3% de callos friables, en ambos casos con una coloración amarillo pálido; por último, Stefanache y colaboradores (2012) utilizaron como explantes hojas, raíz e inflorescencias, siendo las inflorescencias las que presentaron mejor respuesta de inducción en medio sólido y mejor crecimiento y rendimiento en medio líquido, su medio consistió de MS suplementado con 0.5 mg/L de BAP + 1.5 mg/L de 2,4-D. Lo anterior parece indicar que el regulador 2,4-D es importante en la inducción de callogénesis en *A. montana*. Sin embargo, en el presente trabajo el regulador 2,4-D en las dos combinaciones probadas en sus diferentes concentraciones no presentó respuesta en los explantes foliares, lo cual podría tener que ver con el fenotipo de las plantas que fueron fuente de explantes. Cabe destacar, que no se ha reportado el establecimiento de cultivos en suspensión de *A. montana*. Para el presente trabajo se logró formar callos en el 100% de los explantes expuestos a medio MS suplementado con 30 g/L de glucosa, empleando 1 mg/L de Pic + 0.5 mg/L de Kin, dando como resultado un cultivo con células totalmente disgregables y de rápido crecimiento, características ideales para el establecimiento de un cultivo de células en suspensión que podría ser de importancia cuando se desea llevar a cabo el cultivo en biorreactores. Además del empleo de diferentes RCV y distintas concentraciones para inducir callos, se empleó también una fuente de carbono diferente, lo cual podría haber influido en la formación de los callos o la ausencia de respuesta en algunos de los diferentes tratamientos probados.

En un estudio realizado por Ali y colaboradores (2013), caracterizando el crecimiento celular de un cultivo en suspensión de *Artemisia absinthium*, especie taxonómicamente cercana, perteneciente a la familia Asteraceae, misma familia a la que pertenece *A.*

montana, determinaron 3 etapas del crecimiento a partir de un inóculo de 1.5 g de biomasa fresca en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo MS al 100% con 30 g/L de sacarosa, una fase de adaptación que fue de los 0-6 días, seguida de una fase exponencial de los 6-21 días, y por último una fase estacionaria de los 21-42 días, con un tiempo de duplicación de 9 días y una biomasa máxima de 9.20 g/L al día 27. Dichos resultados fueron distintos a los encontrados en este trabajo, donde se presentaron 3 fases del crecimiento celular, una fase de adaptación más breve de los 0-3 días, una fase exponencial de 3-15 días y una fase estacionaria de los 15-30 días, un tiempo de duplicación mayor de 4.06 días y una biomasa máxima de 8.9 g/L al día 15, todo partiendo de un inóculo de 1.5 g en matraces de 125 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo, dichas diferencias en los resultados se deben en principio a que son especies vegetales diferentes, seguido de que son reguladores del crecimiento vegetal distintos, además de la cantidad de inóculo inicial distinto y de la concentración del medio MS que pudo haber influido en el acortamiento de la duración de la cinética de crecimiento, así como de la cantidad de biomasa máxima obtenida, que fue menor a la reportada en *A. absinthium*.

Respecto al contenido de metabolitos secundarios totales a través del tiempo, se encontró que hubo una mayor producción en los 3 últimos tiempos de muestreo de biomasa que corresponden a la fase de estacionaria, siendo el día 30 del cultivo donde se alcanzó una concentración más elevada, que coincide con la mayor actividad antioxidante, propiedad que se le confiere a los compuestos fenólicos. Dicho contenido de metabolitos secundarios podría deberse al estrés abiótico en las células debido a la falta de nutrientes en el medio de cultivo, principalmente la fuente de carbono con la que se inició en 30 g/L y que para el día 30 fue de 1.8 g/L.

Existen diferencias significativas en el contenido de metabolitos secundarios debido a factores intrínsecos de las plantas, según el órgano empleado para la extracción, el origen del material vegetal, la edad de la planta, su nutrición, y factores externos como el método de extracción y el disolvente empleado, entre otros (Douglas *et al.*, 2004; Spitaler *et al.*, 2006; Aiello *et al.*, 2012; Banu & Cathrine, 2015; Alonso-Carillo *et al.*,

2017). Sin embargo, existen pocos reportes de cultivos *in vitro* de células u órganos de *A. montana* y de su contenido fitoquímico, los reportes hasta ahora se han enfocado principalmente en la micropropagación *in vitro* y en el establecimiento de raíces transformadas (Petrova *et al.*, 2012). En un reporte realizado por Craciunescu y colaboradores (2012), empleando un extracto hidroalcohólico de flores de *A. montana* determinaron un contenido de CFT de 97.16 mg/g, un contenido de FvT de 38.62 mg/g y un IC₅₀ de 0.63 mg/mL para la AA. Por otro lado Nikolova y colaboradores (2013) realizaron un estudio del contenido de CFT, FvT y AA de varias fuentes de material vegetal, teniendo como resultados una producción de 23.65 mg/g de CFT, 1.48 mg/g de FvT y una AA con un valor de IC₅₀ mayor a 200 µg/mL a partir de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* sin enraizar y una producción de 24.78 mg/g de CFT, 1.49 mg/g de FvT y una AA con un valor de IC₅₀ mayor a 200 µg/g a partir de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* enraizadas; así como una producción de 38.13 mg/g de CFT, 4.20 mg/g de FvT y un IC₅₀ de 64.01 µg/g a partir de hojas de plantas crecidas en invernadero y una producción de 36.41 mg/g de CFT, 9.21 mg/g de FvT y un IC₅₀ de 85.73 µg/g a partir de flores de plantas crecidas en invernadero; además de una producción de 57.8 mg/g de CFT, 4.54 mg/g de FvT y un IC₅₀ de 33.79 µg/g a partir de hojas de plantas crecidas a campo abierto y una producción de 51.25 mg/g de CFT, 9.5 mg/g de FvT y un IC₅₀ de 60.22 µg/g a partir de flores de plantas crecidas a campo abierto. Para el caso de las LS en el trabajo de Jurkiewics y colaboradores (2010) determinaron un contenido de 7 LS en total por medio de HPLC, en raíces y brotes, extraídas por ultrasonido usando cloruro de metilo, obteniendo 0.0051 y 0.6708 mg/g respectivamente, a partir de plantas crecidas en invernadero durante 6 meses y fertilizadas con nitrógeno, fósforo y potasio (5:4:1) (Jurkiewicz *et al.*, 2010).

Existe una importante necesidad de estandarizar tanto cualitativamente como cuantitativamente el contenido de metabolitos secundarios de los extractos o fracciones del material vegetal medicinal, a través de diferentes parámetros analíticos para asegurar su control de calidad y reproducibilidad, ya que ellos definen la acción fisiológica a tener en el cuerpo humano en investigaciones o en productos

farmacéuticos (Edeoga *et al.*, 2005; Mohan *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013). En este sentido, se analizaron inicialmente de manera cualitativa las fracciones obtenidas de las 3 especies vegetales, para conocer cuáles contenían metabolitos secundarios del tipo fenólico y LS, mismas que son de interés farmacológico contra el cáncer, de manera que se logró discernir entre qué fracciones se realizaría un análisis cuantitativo posterior y selección para su empleo en los bioensayos de la actividad biológica. El análisis cualitativo, es una estrategia de bajo costo y fácil de realizar, que se basa principalmente en reacciones coloridas. Los metabolitos presentes en los extractos y/o fracciones dependen principalmente de su polaridad y de la polaridad del disolvente empleado (Kasolo *et al.*, 2010; Mir *et al.*, 2013). De tal manera que al usar disolventes con diferente polaridad se logró separar y concentrar los metabolitos secundarios en las fracciones, mismas que fueron analizadas, dando como resultado diferencias entre las concentraciones de los grupos de metabolitos en las fracciones. La mayor actividad antioxidante se presentó en las fracciones de *B. cordata*, a pesar de contener las menores cantidades de CFT, FvT y GFPT, metabolitos a los que se les atribuye dicha actividad, lo cual podría deberse a la presencia del VB y linarina que tienen gran actividad antioxidante y que se han reportado estar presente en especies del género *Buddleja* (D'Imperio *et al.*, 2014, Gonçalves *et al.*, 2015).

Al realizar los barridos de los espectros de absorción de las fracciones, se pudo observar que la absorción de la longitud de onda ocurre de los 200-360 nm, en dicho rango se encuentran los CF (Dearden & Forbes, 1959), que corresponde con la información obtenida de la cuantificación de CFT, FvT y GFPT. Para el caso de pigmentos como la clorofila o carotenoides salió negativo el barrido espectrofotométrico, ya que para la clorofila se identifica entre los 400-500 nm y los 600-700 nm, y para los carotenoides entre los 400-500 nm (Talamond *et al.*, 2015), de manera que los cultivos *in vitro* de las 3 especies se podrían tratar de cultivos que han perdido la actividad fotosintética debido a que no existe especialización tisular, más que en el caso del cultivo de raíces en suspensión, que no es un órgano propiamente fotosintético. Para el caso de los terpenos la longitud de absorción se da entre los 220-

320 nm (O'Connor & Goldblatt, 1954), de manera que en el caso de las fracciones de línea celular de *A. montana* existe un pico de absorción a la longitud de onda de 223 nm que podría corresponder a la helenalina (Adams & Herz, 1949), para *T. parthenium* a la longitud de onda aparece un pico a 214 nm que podría corresponder a la partenólida (Govindachari *et al.*, 1965), y para las fracciones de *B. cordata* hay absorbancia a 291 nm que correspondería con el verbascósido (Avila *et al.*, 2014). Sin embargo, haría falta un análisis fitoquímico más preciso para conocer los metabolitos específicos presentes en cada fracción.

La vincristina en combinación con otros fármacos forma parte de la primera línea para el tratamiento del linfoma, sin embargo presenta varios efectos secundarios graves, como polineuropatía axonal dependiente de la dosis, así como estreñimiento, náuseas, fiebre, fatiga, diarrea, entumecimiento y hormigueo en pies y manos, anemia, disminución del apetito, insomnio, entre otros (Moore *et al.*, 2001; Fawcett *et al.*, 2004., Ocean & Vahdat, 2004; Weisfeld-Adams *et al.*, 2007., Silvestre-Donat & Puente, 2008; Allevato, 2008). Por lo que es importante encontrar nuevos agentes quimioterapéuticos o combinaciones con mejor potencia farmacológica, disminuir las dosis sin comprometer la efectividad, disminuir o eliminar los efectos adversos y minimizar o retrasar la resistencia a los fármacos (Kapadia *et al.*, 2013). En este sentido se determinó la actividad citotóxica de las fracciones a diferentes concentraciones y su combinación con vincristina a una dosis baja. Se encontró que la actividad en todos los casos fue dependiente de la concentración, siendo las concentraciones más altas de las fracciones las que tuvieron una mejor actividad citotóxica. Al realizar la exposición de la línea celular a las 8 diferentes fracciones, seguidas de una dosis baja de vincristina se presentó una mayor actividad citotóxica reflejada en el IC₅₀ que va de 12.24-21.26 µg/mL en comparación con la exposición a las fracciones que va de 26.37-60.82 µg/mL o la vincristina 1 nM, lo que nos indica que hubo un efecto potenciado o de la vincristina, ya que las fracciones funcionaron como agentes citotóxicos y posiblemente también como quimiosensibilizantes, debido a que en ellas existe una mezcla de diferentes metabolitos secundarios que podrían estar incidiendo en

diferentes vías de señalización propias de la línea celular de linfoma en una manera sinérgica o aditiva.

9 CONCLUSIONES

Se encontró que la combinación de RCV Pic a 1 mg/L con Kin a 0.5 mg/L inducen el 100% de callogénesis directa en medio semisólido, dando como resultado un callo friable y de rápido crecimiento en medio líquido a partir de explantes foliares de *A. montana*.

Se determinó por medio de la cinética de crecimiento que el CCSAm es una línea celular estable, y que bajo las condiciones de cultivo se logró obtener una biomasa máxima de 8.9 g/L al día 15 y un mayor contenido de metabolitos secundarios tipo fenólico y terpénico al día 30.

Se logró obtener un total de 13 fracciones de los extractos metanólicos para cada especie vegetal, de las cuales solo fueron caracterizadas fitoquímicamente 3 para el CCSAm y para el CRSTp, y 2 para el CCSBc, mostrando diferencias en el contenido de LS, CFT, FvT y GFPT entre las fracciones de cada cultivo en suspensión, así como en la AA.

Las fracciones evaluadas presentaron actividad citotóxica en la línea celular de linfoma (ramos), ya que disminuyeron la viabilidad celular, principalmente a las mayores concentraciones empleadas que fueron de 20, 30 y 40 µg/mL, y su combinación con vincristina 1 nM mejora dicha actividad, mostrando un posible efecto quimiosensibilizador que podría deberse a la presencia de moléculas fenólicas y terpénicas que han sido ya reportadas como potenciales agentes citotóxicos.

10 PERSPECTIVAS

Identificar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones por HPLC-MS y cuantificar los mayoritarios por HPLC para tener fracciones estandarizadas

Realizar ensayos de elicitación en los cultivos en suspensión para potenciar la síntesis de metabolitos secundarios.

Determinar la actividad citotóxica en el mayor número de líneas celulares posibles para posteriormente realizar ensayos con modelos animales en los tipos de cáncer con dicha actividad.

Determinar los mecanismos de acción de las fracciones en las líneas celulares donde presentes actividad citotóxica.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman SA & Suen AB. 2012. A Review of molecular mechanisms of the anti-leukemic effects of phenolic compounds in honey. *International Journal of Molecular Sciences* 13(11): 15054-15073.
- Adams R & Herz W. 1949. Helenalin. I. Isolation and properties. *Journal of American Chemical Society* 71(7): 2546-2551.
- Aguilar-Rodríguez S, Terrazas T, López-Mata L. 2006. Anatomical wood variation of *Buddleja cordata* (Buddlejaceae) along its natural range in Mexico. *Trees* 20: 253-261.
- Aiello N, Bontempo R, Vender C, Ferreti V, Innocenti G & Dall'Acqua S. 2012. Morpho-quantitative and qualitative traits of *Arnica montana* L. wild accessions of Trentino, Italy. *Industrial Crops and Products* 40: 199-203.
- Aldaco-Sarvide F, Pérez-Pérez P, Cervantes-Sánchez G, Torrecillas-Torres L, Erazo-Valle-Solís AA, Cabrera-Galeana P, Motola-Kuba D, Anaya P, Rivera-Rivera S, Cárdenas-Cárdenas E. 2018. Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *Gaceta Mexicana de Oncología* 17:28-34.
- Ali M, Abbasi BH & Ihsan-ul-haq. 2013. Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products* 49: 400-406.
- Alipieva K, Korkina L, Orhan IE & Georgiev MI. 2014. Verbascoside – A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances* 32(6): 1065-1076.
- Allevato MA. 2008. Efectos adversos cutáneos de la terapia antineoplásica. *Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas* 31: 78-91.
- Alonso-Carrillo N, Aguilar-Santamaría M de los Á, Vernon-Carter EJ, Jiménez-Alvarado R, Cruz-Sosa F & Román-Guerrero A. 2017. Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and

evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops & Products* 103: 213-221.

American Cancer Society. 2015. *Cancer Facts & Figures*. Atlanta, Georgia. No. 500815

Anderson KN & Bejcek BE. 2008. Parthenolide Induces Apoptosis in glioblastomas without affecting NF- κ B. *Journal of Pharmacological Sciences* 106: 318 – 320.

Anter J, Tasset I, Demyda-Peyrás S, Ranchal I, Moreno-Millán M, Romero-Jimenez M, Muntané J, Luque de Castro MD, Muñoz-Serrano A & Alonso-Moraga Á. 2014. Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product “alperujo”, hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside. *Mutation Research* 772: 25–33.

Armitage JO & Weisenburger DD. 1998. New approach to classifying Non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. *Journal of Clinical Oncology* 16(8): 2780-2795.

Asgari A & Parvin N. 2013. The analgesic effect of ethanolic extract of *Tanacetum parthenium* in acetic acid model. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 15(8): 22-25.

Aválos GA & Pérez-Urria CE. 2009. Metabolitos secundarios de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal* 2(3): 119-145.

Avendaño C, Menéndez JC. 2008. *Medicinal chemistry on anticancer drugs*. 1a edición, Elsevier, Netherlands.

Ávila AJG, Espinosa GAM, De Maria y Campos DM, Benitez FJ del C, Hernández Delgado T, Flores MS, Campos CJ, Muñoz LJL & García BAM. 2014. Photoprotection of *Buddleja cordata* extract against UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14:281.

Banthorpe DV & Brown GD. 1989. Two unexpected coumarin derivatives from tissue cultures of compositae species. *Phytochemistry* 28: 3003-3007.

- Banu KS & Cathrine L. 2015. General techniques in phytochemical analysis. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science* 2(4): 25-32.
- Barretina J, Caponigro G, Stransky N, *et al.* 2012. The cancer cell line encyclopedia enables predictive modeling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391): 603–607.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68: 394-424.
- Brown AMG, Lowe KC, Davey MR & Power JB. 1996. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): tissue culture and parthenolide synthesis. *Plant Science* 116(2): 223-232.
- Brown GD. 2010. The biosynthesis of artemisinin (qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules* 15: 7603-7698.
- Carrillo-Ocampo D, Bazaldúa-Gómez S, Bonilla-Barbosa JR, Aburto-Amar R & Rodríguez-López V. 2013. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules* 18: 12109-12118.
- Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F & Wagstaff C. 2013. Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences* 14(6): 12780-12805.
- Chaturvedi D. 2011. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 2011:313-334.
- Chavan SS, Damale MG, Shamkuwar PB & Pawar DP. 2013. Traditional medicinal plants for anticancer activity. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 5(4): 50-54.
- Craciunescu O, Constantin D, Gaspar A, Toma L, Utoiu E & Moldovan L. 2012. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chemistry Central Journal* 6:97 (1-12).

- Cuevas-Urióstegui ML, Villasis-Keever MA, Fajardo-Gutiérrez A. 2003. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Pública de México* 45(1): S115-S123.
- Czyz, M., Lesiak-Mieczkowska, Koprowska K, Szulawzka-Mroczek & Wozniak M. 2010. Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. *British Journal of Pharmacology* 160(5): 1144-1157.
- Czyz M, Koprowska K & Sztiller-Sikorska M. 2013. Parthenolide reduces the frequency of ABCB5-positive cells and clonogenic capacity of melanoma cells from anchorage independent melanospheres. *Cancer Biology & Therapy* 14(2): 135–145.
- Del Puerto HM, Casas IL & Cañete VR. 2013. Usos más frecuentes de *Arnica montana*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18(2): 315-326.
- Dearden JC & Forbes WF. 1959. Light absorption studies Part XIV. The ultraviolet absorption spectra of phenols. *Canadian Journal of Chemistry* 37: 1294-1304.
- D'Imperio M, Cardinali A, D'Antuono I, Linsalata V, Minervini F, Redan BW & Ferruzzi MG. Stability-activity of verbascoside, a known antioxidant compound, at different pH conditions. *Food Research International* 66: 373-378.
- Dominguéz XA. 1988. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa México. 281 p.
- Doudach L, Benbacer L, Meddah B, Faouz My El A, Hammani K, El Mzibri M & Cherrah Y. 2013. Extract of 1:5 mixture of five Moroccan medicinal plants has cytotoxic effect on some human cancer cell lines. *International Journal of Pharmacy* 3(2): 301-307.
- Douglas JA, Smallfield BM, Burgess EJ, Perry NB, Anderson RE, Douglas MH & Glennie V leA. 2004. Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: a rapid analytical method and the effects of flower maturity and simulated mechanical harvesting on quality and yield. *Planta medica* 70: 166-170.
- Edeoga HO, Okwu DE & Mbaebie BO. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 4(7): 685-688.

- Esposito E, Dal Toso R, Pressi G, Bramanti P, Meli R & Cuzzocrea S. 2010. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 381:93–105.
- Estrada-Zúñiga ME, Aarland RC, Rivera-Cabrera F, Bernabé-Antonio A, Buendía-González L, Cruz-Sosa F. 2016. Micropropagation of *Buddleja cordata* and the content of verbascoside and total phenols with antioxidant activity of the regenerated plantlets. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15: 333-346.
- Estrada-Zúñiga ME, Cruz-Sosa F, Rodríguez-Monroy M, Verde-Calvo JR & Vernon-Carter EJ. 2009. Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 39-47.
- Estrada-Zúñiga ME, Gutiérrez-Rebolledo GA, Nieto-Trujillo A, Bernabé-Antonio A and Cruz Sosa F. 2019. *Buddleja* species distributed in Mexico against inflammatory diseases, their therapeutic activities, secondary metabolites and biotechnology. *Recent Advances in Biological Research* 5(8): 78-98. Book Publisher International, West Bengal, India.
- Fawcett SL, Grant I, Hall PN, Kelsall AWR & Nicholson JC. 2004. Vincristine as a treatment for a large haemangioma threatening vital functions. *The British Association of Plastic Surgeons* 57: 168-171.
- Gabert J, Beillar E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JLE, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G & van Dongen JJM. 2003. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia-A Europe against cancer program. *Leukemia* 17: 2318-2357.
- Gach K & Janecka A. 2014. α -methylene- γ -lactones as a novel class of anti-leukemic agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 14(5): 688-694.

- Gach K, Szymański J, Pomorska D, Długosz A, Modranka J, Janecki T & Janecka A. 2015. Combined effects of anticancer drugs and new synthetic α -methylene- δ -lactones on MCF-7 cells. *Tumor Biology* 36(8):5971-7.
- Gallardo-Vázquez AC. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, vol. 3, Instituto Indigenista, México, D.F.
- Galon J, Pagès F, Marincola FM, *et al.* 2012. Cancer classification using the immunoscore: a worldwide task force. *Journal of Translational Task Force* 10(205): 1-9.
- George CV, Kumar DRN, Suresh PK & Kumar RA. 2012. A review of the therapeutic potentials of phartenolide: a sesquiterpene lactone. *International Research Journal of Pharmacy* 3: 69-73.
- Ghasemali S, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Tafsiri E, Zarghami N, Rahmati-Yamchi M, Alizadeh E, Barkhordari A, Tozihi M & Kordi S. 2013. Inhibitory effects of β -cyclodextrin-helenalin complexes on H-TERT gene expression in the T47D breast cancer cell line-Results of real time quantitative PCR. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14 (11): 6949-6953.
- Gillet J-P, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, Patel C, Orina JN, Eliseeva TA, Singal V, Padmanabhan R, Davidson B, Ganapathi R, Sood AK, Rueda BR, Ambudkar SV & Gottesman MM. 2011. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(46): 18708–18713.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD & Lander ES. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286(5439): 531-537.

- Gonçalves S, Grevenstuk T, Martins N & Romano A. 2015. Antioxidant activity and verbascoside content in extracts from two uninvestigated endemic *Plantago* spp. *Industrial Crops and Products* 65: 198-202.
- Govindachari TR, Joshi BS & Kamat VN. 1965. Structure of parthenolide. *Tetrahedron* 21: 1509-1519.
- Grech-Baran M, Pietrosiuk A. 2012. *Artemisia* species *in vitro* cultures for production of biologically active secondary metabolites. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* 93:371-380.
- Guillerman RP, Voss SD & Parker BR. 2011. Leukemia and Lymphoma. *Radiologic Clinics* 49(4): 767-797.
- Hussain Md.S, Fareed S, Ansari S, Rahman Md.A, Ahmad IZ & Saeed M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 4(1): 10-20.
- INEGI, 2018. Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Comunicado de prensa 525/18.
- Izumi E, Morello LG, Ueda-Nakamura T, Yamada-Ogatta SF, Dias FBP, Garcia DAC, Piloto FIC, Morgado-Díaz JA & Vatura NC. 2008. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Experimental Parasitology* 118: 324-330.
- Jaiswal R, Kiprotich J & Kuhnert N. 2011. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry* 72: 781-790.
- Jaramillo Antillón J. 2010. Avances y contradicciones (paradojas) en relación con las causas del cáncer. *Acta Médica Costarricense* 52(4): 246-254.
- Jemal ADV, Bray F, Center MM, Ferlay JME, Ward E & Forman D. 2011. Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians* 61 (2): 69-90.

- Jong-Hyun K, Lan L, Seung-Ok L, Yong-Tae K, Kyung-Ran Y & Dae-Ghon K. 2005. Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis. *Cancer Research* 65:6312-6320.
- Jurkiewicz A, Ryszka P, Anielska T, Waligórski P, Białońska D, Góralska K, Tsimilli-Michael M & Turnau K. 2010. Optimization of culture conditions of *Arnica montana* L.: effects of mycorrhizal fungi and competing plants. *Mycorrhiza* 20:293–306.
- Kapadia GJ, Rao GS, Ramachandran C, Lida A, Suzuki N & Tokuda H. 2013. Synergistic cytotoxicity of red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 10(1): 113-122.
- Karuppusamy S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(13): 1222-1239.
- Kasolo JN, Bimenya GS, Ojok L, Ochieng J & Ogwal-Okeng JW. 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(9): 753-757.
- Lagunas-Rangel FA. 2016. Leucemia mieloide aguda. Una perspectiva de los mecanismos moleculares del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncología* 15(3): 150-157.
- Lillo A, Carvajal-Caiconte F, Nuñez D, Balboa N & Alvear Zamora M. 2016. Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 42 (2): 168-174.
- Liu J-W, Cai M-X, Xin Y, Wu Q-S, Ma J, Yang P, Xie H-Y, Huang D-S. 2010. Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29(108): 1-7.

- Lucas DM, Still PC, Bueno PL, Grever MR & Kinghorn AD. 2010. Potential of plant-derived natural products in the treatment of leukemia and lymphoma. *Current Drug Targets* 11(7): 812-822.
- Lu C, Zhou L-Y, Xu H-J, Chen X-Y, Tong Z-S, Liu X-D, Jia Y-S & Chen Y. 2014. RIP3 overexpression sensitizes human breast cancer cells to parthenolide *in vitro* via intracellular ROS accumulation. *Acta Pharmacologica Sinica* 35: 929–936.
- McVaugh, R. 1984. *Compositae. Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico*, Vol. 12. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Majdi M, Liu Q, Karimzadeh G, Malboobi MA, Beekwilder J, Cankar K, de Vos R, Todorović S, Simonović A & Bouwmeester H. 2011. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry* 72: 1739–1750.
- Malarz J, Stojakowska A, Dohnal B & Kisiel W. 1993. Helenalin acetate in *in vitro* propagated plants of *Arnica montana*. *Planta Medica* 59: 51-53.
- Martínez M. 1989. *Las plantas medicinales de México*. 6ª edición, Ediciones Botas, México, D.F.
- May P. 2013. Arnica flower CO₂-extract: Approved efficacy in topical treatment. *Cosmetic Science Technology* 2013:1-6.
- Meneses-García A, Ruiz-Godoy LM, Beltrán-Ortega A, Sánchez-Cervantes F, Tapia-Conyer R & Mohar Alejandro. 2012. Principales neoplasias malignas en México y su distribución geográfica (1993-2002). *Revista de Investigación Clínica* 64: 322-329.
- Mir MA, Sawhney SS & Jassal MMS. 2013. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2(1): 001-005.

- Mohan VR, Chenthurpandy P & Kalidass C. 2010. Pharmacognostic and phytochemical investigation of *Elephantopus scaber* L. (Asteraceae). Journal of Pharmaceutical Science and Technology 2(3): 191-197.
- Moore J, Lee M, Garzon M, Softer S, Kim E, Saouaf R, del Toro G, Yamashiro D & Kandel J. 2001. Effective therapy of a vascular tumor on infancy with vincristine. Journal of Pediatric Surgery 36(8): 1273-1276.
- Morales-Polanco MR. 2000. Clasificación de los linfomas. Gaceta Médica de México 116 (3): 220-237.
- Mulabagal V & Tsay H-S. 2004. Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2(1): 29-48.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum 15:473-497.
- Nakabayashi H & Shimizu K. 2012. Involvement of Akt/NF- κ B pathway in antitumor effects of parthenolide on glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. BMC Cancer 12: 453.
- Nikolova M, Petrova M, Zayova E, Vitkova A & Evstatieva L. 2013. Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* grown plants of *Arnica montana* – polyphenols and free radical scavenging activity. Acta Botanica Croatica 72(1):13–22.
- Ocean AJ & Vahdat LT. 2004. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: pathogenesis and emerging therapies. Support Care Cancer 12: 619-625.
- O'Connor RT & Goldblatt LA. 1954. Correlation of ultraviolet and infrared spectra of terpene hydrocarbons. Analytical Chemistry 26(11): 1726-1737.
- Orofino K MR, Grootjans S, Biavatti MW, Vandenabeele P & D'Herde K. 2012. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. Anti-cancer drugs 23(9): 883-896.

- Pajak B, Gajkowska B & Orzechowski A. 2008. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cell. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 46(2): 129-135.
- Panciu I, Holobiuc I, Cătană R. 2014. The use of biotechnology for supplying of plant material for traditional culture of medicinal, rare species *Arnica montana* L. *Lucrări Științifice* 57(1): 183-188.
- Parada-Turska J, Paduch R, Majdan M, Kandefer-Szerszeń M & Rzeski W. 2007. Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacological Reports* 59: 233-237.
- Pareek A, Suthar M, Rathore GS & Bansal V. 2011. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L): A systematic review. *Pharmacognosy Reviews* 5:103-10.
- Pei S & Jordan CT. 2012. How close are we to targeting the leukemia stem cell? *Best Practice & Research: Clinical Haematology* 25(4): 415-418.
- Pérez-Alonso N & Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 11(4): 195 – 211.
- Pérez-Barrón G, Ávila-Acevedo JG, García-Bores AM, Montes S, García-Jiménez S, León-Rivera I, Rubio-Orsorio M & Monroy-Noyola A. 2014. Neuroprotective effect of *Buddleja cordata* methanolic extract in the 1-methyl-4-phenylpyridinium Parkinson's disease rat model. *Journal of Natural Medicines* 69(1):86-93.
- Petrova M, Zayova E & Vlahova M. 2013. Induction of hairy roots in *Arnica montana* L. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Central European Journal of Biology* 8(5): 470-479.
- Petrova M, Zayova E, Dincheva I, Badjakov I & Vlahova M. 2015. Influence of carbon sources on growth and GC-MS based metabolite profiling of *Arnica montana* L. hairy roots. *Turkish Journal of Biology* 39: 469-478.
- Petrova M, Zayova E, Vassilevska-Ivanova R & Vlahova M. 2012. Biotechnological approaches for cultivation and enhancement of secondary metabolites in *Arnica montana* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 34(5): 1597-1606.

- Petrova M, Zayova E & Vlahova M. 2008. Induction of callus cultures in *Arnica montana* L. Genetics and Breeding 37(3-4): 37-44.
- Pourianezhad F, Tahmasebi S, Abdusi V, Nikfar S & Mirhoseini M. 2016. Review of feverfew, a valuable medicinal plant. Journal of HerbMed Pharmacology 5(2): 45-49.
- Pljevljakušić D, Rančić D, Ristić M, Vujisić L, Radanović D & Dajić-Stevanović Z. 2012. Rhizome and root yield of the cultivated *Arnica montana* L., chemical composition and histochemical localization of essential oil. Industrial Crops and Products 39: 177– 189.
- Ralstin MC, Gage EA, Yip-Schneider MT, Klein PJ, Wiebke EA & Schmidt CM. 2006. Parthenolide cooperates with NS398 to inhibit growth of human hepatocellular carcinoma cells through effects on apoptosis and G0-G1 cell cycle arrest. Molecular Cancer Research 4(6): 387-399.
- Rateb MEM, El-Hawary SS, El-Shamy AM & Yousef EMA. 2007. Production of parthenolide in organ and callus cultures of *Tanacetum parthenium* (L.). African Journal of Biotechnology 6 (11): 1306-1316.
- Riggins RB, Zwart A, Nehra R & Clarke R. 2005. The nuclear factor κ B inhibitor parthenolide restores ICI 182,780 (Faslodex; fulvestrant)–induced apoptosis in antiestrogen-resistant breast cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics 4:33-41.
- Rodríguez-Zaragoza S, Ordaz C, Avila G, Muñoz JL, Arciniegas A & Romo de Vivar A. 1999. *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Buddleia cordata* (Loganiaceae, H.B.K.) on several strains of *Acanthamoeba*. Journal of Ethnopharmacology 66: 327-334.
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Salapovic H, Geier J & Reznicek G. 2013. Quantification of sesquiterpene lactones in Asteraceae plant extracts: evaluation of their allergenic potential. Scientia Pharmaceutica 81(3): 807-818.

- Sánchez de Toledo Codina J & Sábado Álvarez C. 2016. Linfomas de Hodgkin y no Hodgkin. *Pediatría Integral* XX(6):390-400.
- Sánchez O. 1980. La flora del Valle de México. 6ª edición, La Prensa, México.
- Sclaepfer L, Mendoza-Espinoza JA. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41(4): 18-27.
- Schmidt TJ, Bomme U & Alfermann W. 1998. Sesquiterpene lactone content in leaves of *in vitro* and field cultivated *Arnica montana*. *Planta Medica* 64: 268-270.
- Schulz WA. 2007. Molecular biology of human cancers, an advanced student's textbook. Springer, Netherlands.
- Se-Lim K, Thi KTT, Jeon BJ, Kim SH, Kim IH, Lee SO, Lee ST & Kim SW. 2013. Synergistic effect of parthenolide in combination with 5-Fluorouracil in SW480 cells. *Intestinal Research* 10(4):357-364.
- Shafaghat A & Salimi F. 2008. Extraction and determining of chemical structure of flavonoids in *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip from Iran. *Journal of Sciences (Islamic Azad University)* 18 (68): 39-42.
- Sharma SV, Haber DA & Settleman J. 2010. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* 10:241-253.
- Shiffman MA. 2011. *Arnica montana*. *Aesthetic Medicine* 28: 289-294.
- Sierra Arego F & López Rodríguez CM. 2012. Linfoma de Burkitt. *Revista Cubana de Cirugía* 51 (1), ISSN 0034-7493.
- Silvestre-Donat FJ & Puente SA. 2008. Efectos adversos del tratamiento del cáncer oral. *Avances en Odontoestomatología* 24(1): 111-121.

- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI & Bahorun T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 579(1-2): 200-213.
- Spitaler R, Schlorhauser D, Ellmerer EP, Merfort I, Bortenschlager S, Stuppner H & Zidorn C. 2006. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry* 67: 409-417.
- Stefanache C, Danila D, Necula R, Gille E & Vantu S. 2012. In vivo and in vitro phytochemical studies of *Arnica montana* species from Romanian eastern carpathians. *Acta Horticulturae* 955: 143-148.
- Sun J, Zhang C, Bao Y-L, Wu Y, Chen Z-L, Yu C-L, Huang Y-X, Sun Y, Zheng L-H, Wang Xue & Li Y-X. 2014. Parthenolide-induced apoptosis, autophagy and suppression of proliferation in HepG2 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(12): 4897-4902.
- Sweeney CJ, Mehrotra S, Sadaria MR, Kumar S, Shortle NH, Roman Y, Sheridan C, Campbell RA, Murry DJ, Badve S & Nakshatri H. 2005. The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 4:1004-1012.
- Talamond P, Verdeil JL & Conéjéro G. 2015. Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules* 20: 5024-5037.
- Torre LA, Siegel RL, Ward SE & Jemal A. 2016. Global cancer incidence and mortality rates and trends-An update. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 25(1): 16-27.
- Torres-Sánchez LE, Rojas-Martínez R, Escamilla-Núñez C, de la Vara-Salazar E, Lazcano-Ponce E. 2014. Tendencias en la mortalidad por cáncer en México de 1980 a 2011. *Salud Pública de México* 56(5): 473-491.

- Tiuman TS, Ueda-Nakamura T, Garcia CDA, Filho BPD, Morgado-Díaz JA, de Souza W & Nakamura CV. 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(1): 176-182.
- Vertuani S, Beghelli E, Scalambra E, Malisardi G, Copetti S, Dal Toso R, Baldisserotto A & Manfredini S. 2011. Activity and stability studies of verbascoside, a novel antioxidant, in dermo-cosmetic and pharmaceutical topical formulations. *Molecules* 16: 7068-7080.
- Voskoglou-Nomikos T, Pater JL & Seymour L. 2003. Clinical predictive value of the *in vitro* cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clinical Cancer Research* 9: 4227–4239.
- Waizel-Bucay J & Cruz-Juárez M de L. 2014. *Arnica montana* L., planta medicinal europea con relevancia. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 5(25): 98-109.
- Weinberg RA. 2007. The biology of cancer. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. United States of America. p 55.
- Weisfeld-Adams JD, Dutton GN & Murphy DM. 2007. Vincristine sulfate as a possible cause of optic neuropathy. *Pediatric Blood & Cancer* 48: 238-240.
- Wilson SA & Roberts SC. 2012. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal* 10(3): 249–268.
- Woerdenbag HJ, Merfort I, Schmidt TJ, Passreiter CM, Willuhn G, Van Huden, Pras N & Konings AWT. 1995. Decreased helenalin-induced cytotoxicity by flavonoids from *Arnica* as studied in a human lung carcinoma cell line. *Phytomedicine* 2(2): 127-132.
- Woisky R & Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Agricultural Research* 37: 99-105.
- Wu H, Guo J, Chen S, Liu X, Zhou Y, Zhang X & Xu X. 2013. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their

metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72: 267-291.

Wyřębska 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 Reports* 40:1655–1663.

Yamori T. 2003. Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 52: S74-S79.

Yip-Schneider MT, Nakshatri H, Sweeney CJ, Marshall MS, Wiebke EA & Schmidt CM. 2005. Parthenolide and sulindac cooperate to mediate growth suppression and inhibit the nuclear factor-KB pathway in pancreatic carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 4(4): 587-594.

Zanotto-Filho A, Braganhol E, Schröder R, T. de Souza LH, Dalmolin RJS, Bittencourt PMA, Gelain DP, Oliveira BAM & Fonseca MJC. 2011. NFkB inhibitors induce cell death in glioblastomas. *Biochemical Pharmacology* 81: 412–424.

Zhou J, Zhang H, Gu P, Bai J, Margolick JB & Zhang Y. 2008. NF-κB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 111(3): 419–427.

ANEXO: PUBLICACIÓN DE ARTÍCULO CIENTÍFICO



Revista Mexicana de Ingeniería Química

ISSN: 1665-2738

amidiq@xanum.uam.mx

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

México

Nieto-Trujillo, A.; Buendía-González, L.; García-Morales, C.; Román-Guerrero, A.; Cruz-Sosa, F.; Estrada-Zúñiga, M.E.

PHENOLIC COMPOUNDS AND PARTHENOLIDE PRODUCTION FROM *in vitro*
CULTURES OF *Tanacetum parthenium*

Revista Mexicana de Ingeniería Química, vol. 16, núm. 2, 2017, pp. 371-383

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Distrito Federal, México

Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62052087004>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's homepage in redalyc.org

redalyc.org

Scientific Information System

Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal

Non-profit academic project, developed under the open access initiative



PHENOLIC COMPOUNDS AND PARTHENOLIDE PRODUCTION FROM *in vitro* CULTURES OF *Tanacetum parthenium*

PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y PARTENOLIDA EN CULTIVOS *in vitro* DE *Tanacetum parthenium*

A. Nieto-Trujillo¹, L. Buendía-González², C. García-Morales²,
A. Román-Guerrero¹, F. Cruz-Sosa^{1*}, M.E. Estrada-Zúñiga³

¹Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Arlixco N° 186, Col. Vicentina C.P. 09340, México D.F.

²Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 15.5, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

³Centro de Investigación en Recursos Bióticos-Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 14.5, San Cayetano C.P. 50295, Toluca, Estado de México, México.

Received December 28, 2016; Accepted February 28, 2017

Abstract

Tanacetum parthenium has gained attention for drug development due to its production of bioactive secondary metabolites, such as phenolic compounds (PHEC) and parthenolide (PTN). This work investigated the differences in the production of those compounds among *in vitro* cultures (organs from plantlets and roots cultures) of *T. parthenium*. Results showed that the *in vitro* cultures produced PHEC and PTN, which depended on the type of culture and the incubation time. The content of secondary metabolites was higher in shoots of plantlets (S-ivPL), followed by root cultures (R-ivC) and roots of plantlets (R-ivPL). The PHEC and PTN production was enhanced in plantlets by applying a combination of plant growth regulators (PGRs: α -naphthalenacetic acid [NAA] at 0.27 μ M with kinetin [KIN] at 2.32 μ M). The highest content of secondary metabolites (62.54 mg gallic acid equivalents g^{-1} ; 4.261 and 4.973 mg chlorogenic acid g^{-1} ; 0.858 and 1.015 mg caffeic acid g^{-1} ; 1.931 mg salicylic acid g^{-1} ; 0.071 mg PTN g^{-1}) was found in the PGRs-treated S-ivPL samples. Also, morphogenesis and growth of plantlets was enhanced by these PGRs.

Keywords: *Tanacetum parthenium*, parthenolide, phenolic compounds, *in vitro* cultures, bioactive secondary metabolites

Resumen

Tanacetum parthenium ha ganado la atención para el desarrollo de fármacos por su capacidad para producir metabolitos secundarios bioactivos, tales como compuestos fenólicos (CFEN) y partenolida (PTN). El presente trabajo investigó las diferencias en la producción de dichos metabolitos entre cultivos *in vitro* (órganos de plántulas y cultivos de raíces) de *T. parthenium*. Los resultados mostraron que los cultivos *in vitro* produjeron CFEN y PTN, la cual dependió del tipo de cultivo y del tiempo de incubación. El contenido de los metabolitos secundarios fue mayor en brotes de plántulas (B-ivPL), seguido de cultivos de raíces (R-ivC) y raíces de plántulas (R-ivPL). La producción de CFEN y PTN fue potenciada en las plántulas al aplicar una combinación de reguladores de crecimiento vegetal (RCVs: ácido α -naftalenacético 0.27 μ M y cinetina 2.32 μ M). Los mejores contenidos de metabolitos secundarios (62.54 mg equivalentes de ácido gálico g^{-1} de fenoles totales; 4.261 y 4.973 mg ácido clorogénico g^{-1} ; 0.858 y 1.015 mg ácido cafeico g^{-1} ; 1.931 mg ácido salicílico g^{-1} ; 0.071 mg PTN g^{-1}) fueron encontrados en B-ivPL tratados con RCVs. También, la morfogénesis y el crecimiento de las plántulas fueron potenciadas con los RCVs.

Palabras clave: *Tanacetum parthenium*, compuestos fenólicos, partenolida, cultivos *in vitro*, metabolitos secundarios bioactivos.

* Corresponding author. E-mail: mail: cuhp@xanum.uam.mx
Tel. 52-55-5804-4714; fax: 52-55-5804-4712