



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Evaluación de la actividad citotóxica del extracto metanólico de *Tanacetum parthenium* en líneas celulares de cáncer

**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestro en Biología Experimental

**PRESENTA**

Biol. Exp. Aurelio Nieto Trujillo

Comité tutorial:

Codirector: Dr. Francisco Cruz Sosa

Codirector: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Asesora: María del Carmen Escobar Villanueva

México, D.F., Julio del 2015

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental (periodo 2013-2015), en la UAM- Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario 300569.



**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL del alumno AURELIO NIETO TRUJILLO, matrícula 2133801824, quien cumplió con los 176 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha treinta y uno de julio del 2015 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE *Tanacetum parthenium* EN LINEAS CELULARES DE CANCER

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 216 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR

**JURADO**

Presidenta

MTRA. MARIA DE LOURDES MARTINEZ  
 CARDENAS

Secretaria

DRA. MARIA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

Vocal

DRA. MARIA DEL CARMEN ESCOBAR  
 VILLANUEVA

Vocal

DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS  
 BARRERA

## **COMITÉ TUTORAL**

### **Codirector:**

Dr. Francisco Cruz Sosa

Profesor Titular "C" T.C. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, R-003.

Depto. Biotecnología. D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Iztapalapa.

cuhp@xanum.uam.mx

### **Codirector:**

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular "C" T.C. Laboratorio de Farmacología, S-348.

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Iztapalapa

aaaf@xanum.uam.mx

### **Asesora:**

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva

Laboratorio de Farmacología, S-348.

Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Iztapalapa

mcaresvi@yahoo.com.mx

## Resumen.

La partenólida es una lactona sesquiterpénica que posee actividad antitumoral y es producida por especies del género *Tanacetum*. Sin embargo la biosíntesis de la partenólida en plantas que crecen en campo abierto muestra variaciones en su contenido debido a factores ambientales y genotípicos, de esta manera, el cultivo de tejidos vegetales, al contar con condiciones ambientales controladas puede servir como una alternativa para la obtención de la partenólida. En este trabajo se logró establecer un cultivo de raíces *in vitro* de *T. parthenium* para la producción de la partenólida con un rendimiento de 0.0292 mg/g de biomasa seca a los 32 días de la siembra del inóculo en matraces. Con la biomasa obtenida de las raíces se realizó un extracto metanólico para probar su actividad citotóxica a diferentes concentraciones en dos líneas celulares de cáncer, hepatoblastoma (HepG2) e insulinoma (RINm5F), por medio del ensayo de reducción del MTT y del ensayo de captación del rojo neutro (RN), encontrándose en ambos bioensayos una disminución en la funcionalidad celular al incrementar la concentración del estándar de la partenólida; la mayor disminución de la funcionalidad celular (25% para HepG2 y 47% para RINm5F con el ensayo de MTT y de 82% en RINm5F con el ensayo de RN) ocurrió con partenólida a concentraciones de 40 y 50  $\mu\text{M}$  respectivamente para MTT y de 50  $\mu\text{M}$  para RN pero no con el extracto metanólico conteniendo partenólida a la misma concentración que el estándar, efecto debido a posible actividad antagónica de fenoles contenidos en los extractos metanólicos (como el ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido salicílico, ácido p-coumárico y verbascósido).

## **Abstract.**

Parthenolide is a sesquiterpene lactone with anti-inflammatory effects which occurs naturally in the plant feverfew *Tanacetum parthenium*. Biosynthesis of parthenolide in wild plants show variations in content due to environmental factors and genotypic, so that the plant tissue culture with controlled environmental conditions can serve as an alternative for parthenolide production in standardized concentrations. The aim of this work was establish a root culture *in vitro* of *T. parthenium* to evaluate the production of parthenolide, the production reached maximum level was 0.0292 mg/g dry weight biomass during 32 days of culture. Cytotoxic activity of methanolic extract from fresh biomass of root culture was tested in two cancer cell lines, hepatocellular carcinoma (HepG2) and insulinoma (RINm5F) by two cytotoxicity assays: MTT cell proliferation assay and neutral red release assay, in all bioassays there was a decrease in number of viable cells in culture by effect of parthenolide standard; the largest decrease in cell function (25% to HepG2 and 47% to RINm5F for MTT cell proliferation bioassay and 82% to RINm5F for NR release assay) occurred with parthenolide at 40 y 50  $\mu$ M for MTT and 50  $\mu$ M for NR, respectively; but not by the methanolic extract contain parthenolide at same concentration as the standard. This effect is probably due to antagonistic activity of phenolic compounds contain in methanolic extract (chlorogenic acid, caffeic acid, salicylic acid, p-coumaric acid and verbascoside).

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANA	Ácido $\alpha$ -naftalenacético
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American type culture collection
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ED <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IL-8	Interleucina 8
LMA	Leucemia mieloide aguda
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
MS	Murashige y Skoog
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaClO	Hipoclorito de sodio
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBS	Buffer de fosfato salino (pH 7.38-7.39)
pH	Potencial de hidrógeno
PTFE	Politetrafluoroetileno
RCV	Regulador del crecimiento vegetal

RN	Rojo neutro o 3 amino-7 dimetil amino-2 metil
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium culture
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
°C	Grados centígrados
5-FU	5-fluorouracilo



## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
1 ANTECEDENTES .....	3
1.1 El cáncer.....	3
1.2 Las plantas, fuente de nuevos fármacos .....	6
1.3 <i>Tanacetum parthenium</i> .....	7
1.3.1 Descripción botánica y usos.....	7
1.3.2 Clasificación taxonómica.....	9
1.3.3 Metabolitos secundarios identificados en <i>T. parthenium</i> .....	10
1.3.3.1 Lactonas sesquiterpénicas.....	10
1.3.3.2 Flavonoides.....	11
1.3.3.3 Compuestos volátiles.....	12
1.3.4 Actividad anticancerígena de la partenólida.....	12
1.4 Cultivo de tejidos vegetales con fines de fitofarmacología .....	14
1.5 Líneas celulares de cáncer .....	15
1.5.1 Ensayos de citotoxicidad in vitro .....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	18
3 HIPÓTESIS .....	19
4 OBJETIVOS .....	20
4.1 Objetivo general.....	20

4.2 Objetivos particulares .....	20
5 MATERIAL Y MÉTODO .....	21
5.1 Material Vegetal .....	21
5.1.1 Establecimiento del cultivo aséptico.....	21
5.1.2 Inducción de raíces .....	22
5.1.3 Proliferación del cultivo de raíces y cinética de crecimiento .....	22
5.2 Extracción .....	22
5.2.1 Cuantificación de partenólida por HPLC.....	23
5.3 Cultivo de líneas celulares de cáncer .....	25
5.3.1 Pruebas de citotoxicidad .....	26
5.4 Análisis estadístico .....	28
6. RESULTADOS .....	29
6.1 Tratamientos con regulador del crecimiento vegetal.....	29
6.2 Caracterización de la producción de biomasa: cinética del crecimiento.....	31
6.3 Caracterización de la producción de fenoles totales.....	32
6.4 Cuantificación de partenólida por HPLC.....	33
6.5 Rendimiento de extracción.....	35
6.6 Funcionalidad celular.....	35
7 DISCUSIÓN.....	41
8 CONCLUSIONES.....	46
9 PERSPECTIVAS .....	47

10 BIBLIOGRAFÍA.....48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadísticas globales sobre el cáncer.....	5
Figura 2. Descripción taxonómica de <i>Tanacetum parthenium</i> .....	10
Figura 3. Estructura química de la lactona sesquiterpénica partenólida.....	11
Figura 4. Cultivo de raíces obtenido con 3 mg/L de ANA a partir de explante foliar de <i>T. parthenium</i> después de 30 días de incubación a) medio solido; b) cultivo en suspensión .....	30
Figura 5. Cinética de crecimiento de cultivos de raíz en suspensión de <i>T. parthenium</i> . a) Curva de crecimiento en base a escala logarítmica y b) consumo de glucosa del medio de cultivo.....	32
Figura 6. Producción de fenoles totales en el cultivo de raíz en suspensión de <i>T. parthenium</i> a lo largo de 38 días de incubación.....	33
Figura 7. Efecto de la partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) de la línea HepG2 a 24 h del tratamiento.....	36
Figura 8. Efecto del extracto metanólico de <i>T. parthenium</i> a distintas concentraciones según su contenido de partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) de la línea HepG2 a 24 h de tratamiento.....	36
Figura 9. Efecto de la partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento. ....	37

Figura 10. Efecto del extracto metanólico de *T. parthenium* a distintas concentraciones según su contenido de partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento.....38

Figura 11. Efecto de la partenólida sobre la funcionalidad de los lisosomas (ensayo de RN) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento.....39

Figura 12. Efecto del extracto metanólico de *T. parthenium* a distintas concentraciones según su contenido de partenólida sobre la funcionalidad de los lisosomas (ensayo de RN) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento.....39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente programado en el quipo HPLC para la cuantificación de la partenólida y compuestos fenólicos .....	25
Tabla 2. Efecto del ácido naftalenacético (ANA) sobre la inducción de raíz en explantes foliares de <i>T. parthenium</i> después de 30 días de incubación .....	30
Tabla 3. Compuestos fenólicos identificados en las raíces de <i>T. parthenium</i> cultivadas <i>in vitro</i> al día 32 y sus respectivas actividades biológicas.....	34

## INTRODUCCIÓN

Con base en información etnobotánica se han seleccionado especies vegetales para su análisis químico preliminar. Esto con la finalidad de identificar los tipos de compuestos presentes y evaluar su actividad biológica a través de bioensayos de toxicidad. Para la detección preliminar de agentes con actividad anticancerígena derivados de plantas se han empleado diversas líneas celulares derivadas de tumores humanos. Los ensayos consisten en exponer a las líneas celulares a la sustancia o extracto en estudio por un periodo determinado de tiempo, al cabo del cual se evalúa la viabilidad celular. La capacidad citotóxica de los agentes estudiados es interpretada como un indicativo de actividad potencial anticáncer (Cordero y Aristizeibal, 2002).

Las plantas del género *Tanacetum* son reconocidas dentro de la etnobotánica por sus propiedades medicinales, lo que ha conllevado a la identificación de compuestos. Los constituyentes comúnmente encontrados en estas especies son los sesquiterpenoides, incluyendo lactonas sesquiterpénicas, los cuales pueden ser los responsables de sus propiedades medicinales (Shioji *et al.*, 2005). Las lactonas sesquiterpénicas han mostrado actividad antiinflamatoria, la cual se ha asociado con la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual también tiene un papel central en la regulación de la homeostasis celular, apoptosis, crecimiento tumoral y actividad citotóxica. Estos compuestos, por lo tanto, representan una fuente potencial para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer (Rosselli *et al.*, 2012). La partenólida es una lactona sesquiterpénica aislada de *Tanacetum parthenium*

(Kim *et al.*, 2012) la cual ha mostrado inducción de apoptosis y reducción de la metástasis en células de carcinoma (Ralstin *et al.*, 2006). Numerosos estudios *in vitro* con la partenólida han mostrado propiedades antitumorales en diferentes tipos de cáncer, como por ejemplo: carcinoma de laringe, carcinoma de nasofaringe, leucemia, melanoma, cáncer de mama, etc. (Won *et al.*, 2004; Sweeney *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Riggins *et al.*, 2005; Hassane *et al.*, 2010; Czyz *et al.*, 2013).

Las técnicas biotecnológicas, específicamente el cultivo de tejidos vegetales, tienen un papel esencial en la exploración de alternativas de producción controlada de compuestos bioactivos a partir de plantas. La capacidad de las células, tejidos y órganos vegetales para producir y acumular muchos de los compuestos bioactivos de interés farmacéutico, ha sido reconocida desde el inicio de desarrollo de la tecnología *in vitro*. Actualmente la fuerte y creciente demanda de productos naturales en los mercados ha propiciado el interés del cultivo de tejidos vegetales para su obtención sustentable (Karuppusamy, 2009).



# 1 ANTECEDENTES

## 1.1 El cáncer

Se denomina cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células y su invasión a otros tejidos (metástasis). Si esta propagación no se controla puede causar la muerte. Su causa se debe a factores tanto externos (tabaco, organismos infecciosos, alimentación deficiente, sustancias químicas y radiación) como internos (mutaciones heredadas, hormonas, problemas inmunitarios y mutaciones debidas al metabolismo). Los factores causales pueden ejercer su acción en conjunto o en secuencia para iniciar o promover el desarrollo del cáncer (Bandi *et al.*, 2012).

La evolución de la célula normal a una cancerosa (neoplásica) implica procesos por los cuales los genes implicados en los mecanismos homeostáticos normales que controlan la proliferación y la muerte celular sufren daños a nivel genético (mutaciones), que resultan en la activación de genes que estimulan la proliferación o la protección contra la muerte celular (apoptosis), los oncogenes, y la inactivación de genes que normalmente inhiben la proliferación, los genes supresores de tumores (Bertram, 2000). La proliferación excesiva es el resultado de la pérdida del control de un proceso básico celular como es la capacidad de duplicar su contenido en el DNA y otros muchos componentes, dando lugar a dos células hijas. Si tanto el funcionamiento como la morfología de la célula son el resultado de la expresión de un conjunto de sus genes, el cáncer debe originarse como consecuencia de la

alteración o mutación inicial de algún gen. Esta mutación iniciadora debe conferir una mayor capacidad de proliferación, permitiendo sobrepasar los mecanismos que controlan la división celular (Muñoz, 1997). Adicionalmente, se ha observado que las mutaciones pueden propiciar una resistencia a las terapias convencionales empleadas para su erradicación.

Los vasos sanguíneos son un componente importante del estroma tumoral (células no neoplásicas) y por lo tanto la angiogénesis es un factor predictor del pronóstico en muchas neoplasias humanas y tanto es así, que se considera existe una correlación importante entre el número y la densidad de los vasos sanguíneos con los estados metastásicos, tamaño del tumor, tipo histológico y por consiguiente grado de malignidad tumoral (Sánchez, 2001).

El cáncer puede afectar a cualquier persona. El riesgo de ser diagnosticado con cáncer aumenta con la edad, debido a que la mayoría de los cánceres requiere muchos años para desarrollarse (Ferlay *et al.*, 2007). Sin embargo, como la población hispanoamericana es joven, una mayor proporción de cánceres se diagnostica a edades más jóvenes; 26% de los diagnósticos de cáncer se hace en personas menores de 50 años de edad, en comparación con solo 12% entre los no hispanoamericanos. El cáncer es la principal causa de mortalidad entre los hispanoamericanos, y representa un 21% de los fallecimientos en general y un 15% de fallecimientos entre los niños (Bandi *et al.*, 2012). En el mundo, en el 2012 (año más reciente del que se cuenta con información disponible):

- 14.1 millones de casos nuevos de cáncer fueron diagnosticados.
- 8.2 millones de personas murieron por cáncer.
- 32.6 millones de personas habían llegado a la marca de 5 años de supervivencia al cáncer (personas que estaban vivas cinco años después de haber recibido el diagnóstico de cáncer).

Se anticipa que para el año 2025 se diagnosticarán 19.3 millones de casos nuevos de cáncer al año (<http://www.cdc.gov/>).

El cáncer de hígado (6% de todos los casos diagnosticados; 782,000 personas) es uno de los tipos más comunes y la segunda causa de muerte por cáncer (9% de todas las muertes por cáncer; 745,000 personas). Y en el caso de muertes por cáncer de páncreas ocupa el séptimo lugar (4% de todas las muertes por cáncer; 330,000 personas) (Figura 1).

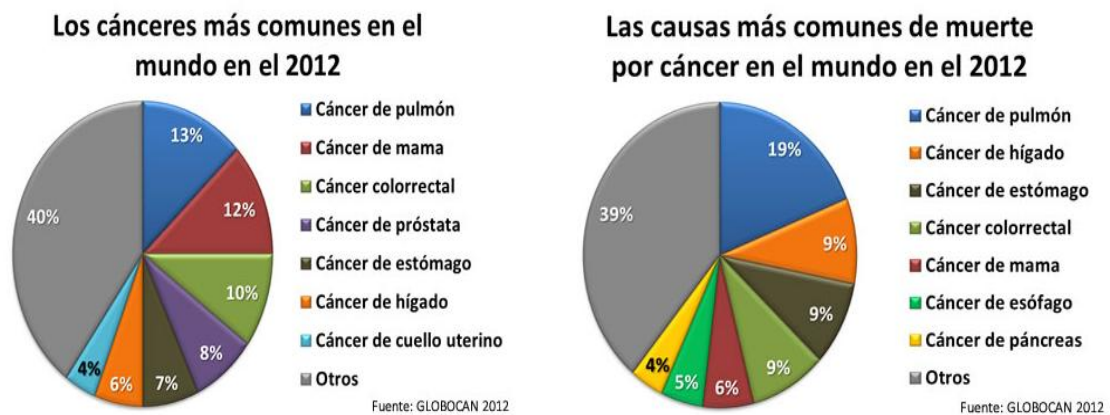


Figura 1. Estadísticas globales sobre el cáncer.

Uno de los factores limitantes en los tratamientos utilizados para la cura del cáncer es la toxicidad o daño que se le hace a los tejidos normales. Las altas dosis de radiaciones y agentes quimioterapéuticos necesarias para matar células tumorales resistentes podría conducir a la muerte del paciente como resultado de la toxicidad sobre los tejidos normales. El éxito consiste en encontrar la forma de matar selectivamente las células tumorales sin afectar al tejido normal (Ríos & Hernández, 2001).

## **1.2 Las plantas, fuente de nuevos fármacos**

Desde la prehistoria se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones. Las plantas son potencialmente efectivas gracias a su contenido de metabolitos secundarios, los cuales son compuestos de bajo peso molecular que son sintetizados y acumulados en la planta en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico; éstos se pueden clasificar en compuestos nitrogenados (alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos) y compuestos no nitrogenados (terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides) (Marcano y Hasegawa, 2002; Sepúlveda *et al.*, 2003). Dichos metabolitos pueden ser una fuente importante de compuestos con actividad biológica, entre las que se incluye la actividad anticancerígena.

Los productos naturales representan el 50% de los fármacos de uso clínico en países desarrollados, de las cuales el 25% corresponde a plantas superiores (Téllez *et al.*, 2004; Mongelli y Pomillo., 2002). Las plantas medicinales utilizadas como materia

prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias puras, representa un área en expansión (Sharapin, 2000). Entre las razones que justifican el interés creciente por las plantas medicinales se pueden citar: la falta de nuevos descubrimientos por los procesos tradicionales de síntesis química de moléculas farmacológicamente activas y de posible uso terapéutico, los efectos secundarios producto del uso correcto o abusivo de algunos fármacos sintéticos y el cambio de perfil del consumidor que, desde finales de la década de 1980, está prefiriendo los productos naturales en detrimento de los productos sintéticos en todos los segmentos del mercado, abarcando de esta manera el sector de salud. Las plantas medicinales contienen, generalmente, más de una sustancia activa y diversas sustancias inactivas que influyen en la acción de los componentes activos (Sharapin, 2000). Tal es el caso de la especie *Tanacetum parthenium* a la cual se le ha atribuido actividad farmacológica en el tratamiento de la fiebre, dolor de cabeza, migraña y malaria (Kemper, 1999).

### **1.3 *Tanacetum parthenium***

#### **1.3.1 Descripción botánica y usos**

Es una hierba perenne que crece hasta 1 m de alto. Sus tallos son más o menos ramificados, erectos, con pelillos y glándulas (principalmente en los tallos más jóvenes). 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. Cada cabezuela, aunque tiene el aspecto de una flor, es en realidad una inflorescencia formada por pequeñas flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo convexo, que no presenta brácteas (páleas) sobre él, es decir desnudo, el conjunto de flores está rodeado por fuera por aproximadamente 50 brácteas dispuestas en 2 series que constituyen un involucre subhemisférico, las brácteas exteriores lineares, las interiores oblongas, hasta de 4 mm de largo. Flores liguladas 10 a 21 (o más en algunas formas cultivadas), femeninas, ubicadas en la periferia de la cabezuela, la corola es un tubo corto en la base y a manera de cinta en la mayor parte de su longitud, semejando un pétalo de una flor sencilla, su forma es oblonga, curvada y algo rígida, de color blanco y de 2.5 a 8 mm de largo. Flores del disco aproximadamente 250, hermafroditas, ubicadas en la parte central; la corola es un tubo que hacia el ápice se ensancha (“garganta”) 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 (Figura 2) (McVaugh, 1984; Rzedowski-Rzedowski, 2001).

*Tanacetum parthenium* es una planta medicinal utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la fiebre, dolores de cabeza por migraña, artritis reumatoide, dolores de estómago, dolores de muelas, picaduras de insectos, infertilidad y problemas con la menstruación y el trabajo durante el parto. También se ha utilizado para la psoriasis, alergias, asma, tinnitus, mareos, náuseas, y vómitos (Pareek *et al.*, 2011).

### **1.3.2 Clasificación taxonómica**

Reino: *Plantae*

Subreino: *Trachiobionta*

Súperdivisión: *Spermatophyta*

División: *Mangliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Tanacetum*

Especie: *Tanacetum parthenium* (L). Schultz-Bip (Figura 2).



Figura 2. Descripción taxonómica de *Tanacetum parthenium*.

### **1.3.3 Metabolitos secundarios identificados en *T. parthenium***

#### **1.3.3.1 Lactonas sesquiterpénicas**

Más de 30 lactonas sesquiterpénicas han sido identificadas en *T. parthenium*. En general, hay 5 diferentes tipos de lactonas sesquiterpénicas que pueden ser clasificadas por la estructura química de su anillo, tales como germacranólidas, guayanólidas, eudesmanólidas, xantanólidas y elemanólidas. *T. parthenium* contiene eudesmanólidas, germacranólidas y guayanólidas. La partenólida es una germacranólida que se ha determinado como compuesto citotóxico presente en flores, hojas y tallos de *T. parthenium* (Figura 3) (Pareek *et al.*, 2011).



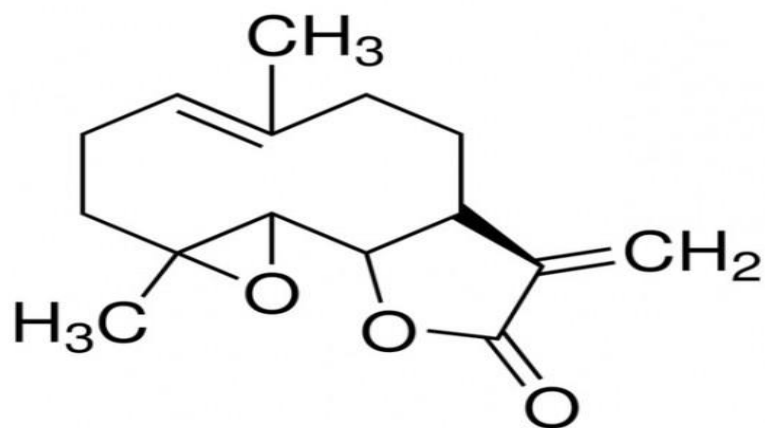


Figura 3. Estructura química de la lactona sesquiterpénica partenólida.

También se han aislado las siguientes lactonas sesquiterpénicas en los distintos órganos de la planta: artecanina, artemorina, balcanina, canina, costunólido, 10-epicanina, epoxiartemorina, 1- $\beta$ -hidroxiarbusculina, 3- $\beta$ -hidroxicostunólido, 8- $\alpha$ -hidroxiestagiatina, 8- $\beta$ -hidroxireynosina, 3- $\beta$ -hidroxipartenólida, manolialida, reinosina, santamarina, epoxisantamarina, secotanapartenólida A, secotanapartenólida B, tanapartina- $\alpha$ -peróxido y 3,4- $\beta$ -epoxi-8-deoxicumambrina B (Pareek *et al.* 2011).

### 1.3.3.2 Flavonoides y otros fenilpropanoides

Los siguientes flavonoides han sido aislados de flores, hojas y/o semillas de *T. parthenium*: 6-hidroxicamferol 3,6-dimetil éter, 6-hidroxicamferol-3,6,4'-trimetil éter (tanetina), quercetagetina 3,6-dimetil éter, quercetagetina 3,6,3'-trimetil éter (acompañado por el isómero 3,6,4'-trimetil éter), quercetina, apigenina (también apigenina 7-glucurónido), luteolina (también luteolina 7-glucurónido), crisoeriol, santina, jaceidina y centaureidina (Pareek *et al.* 2011).

Otros metabolitos secundarios del tipo fenilpropanoide (también conocidos como compuestos fenólicos) que han sido aislados de *T. parthenium* son la cumarina isofraxidina, el 9-epipectacol B y el (2-gliceril)-O-coniferaldehído a partir de raíces (Banthorpe *et al.* 1989; Pareek *et al.* 2011).

### **1.3.3.3 Compuestos volátiles**

En la parte aérea de *T. parthenium* se han identificado 23 compuestos volátiles, representando el 90.1% o más de éstos compuestos. Los componentes principales son el alcanfor (56.9%), canfeno (12.7%), p-cimeno (5.2%) y acetato de bornilo (4.6%). Otros componentes identificados incluyen tricileno,  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, crisanteona, pinocarvona, borneol, terpineno-4-ol, p-cimen-8-ol,  $\alpha$ -terpineol, mirtenal, carvacrol, eugenol, acetato transmirtenol, isobornil 2-metil butanato y oxido cariofileno (Shafaghat *et al.* 2008; Pareek *et al.* 2011).

### **1.3.4 Actividad anticancerígena de la partenólida**

La partenólida producida por *T. parthenium* es una molécula altamente reactiva debido a su estructura: al anillo, el epóxido y los grupos metileno, lo cual ha sido asociado a su acción citotóxica en líneas celulares de cáncer, a través de su efecto en la interrupción de la replicación del ADN, generación de estrés oxidante, eliminación intracelular del grupo tiol, lo que altera la función de proteínas estructurales como receptores de membrana y de factores de transcripción implicados en cáncer, incremento de estrés del retículo endoplasmático y disfunción

mitocondrial, que derivan en apoptosis. La partenólida ha mostrado actividad anticáncer en varias líneas celulares humanas de cáncer (Pareek *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la partenólida induce apoptosis en células de cáncer colorectal humano (Zhang *et al.*, 2004) y células de carcinoma hepatocelular sarcomatoide invasivo, mayormente a través de la inducción de estrés oxidante (Wen *et al.*, 2002).

Después de un tratamiento combinado de 5-fluorouracilo (5-FU) y partenólida, aumentó la muerte celular apoptótica por la activación de las caspasas 3 y 8 de células de cáncer de colorrectal (Kim *et al.*, 2012).

Estudios moleculares demostraron que la partenólida suprime la expresión de genes y proteínas de factores angiogénicos. Además, la partenólida reduce la fosforilación de la vía Akt y activa la señalización mitocondrial, sugiriendo que la función antitumoral de la partenólida puede estar mediada no únicamente por la inhibición de NF- $\kappa$ B sino también por la inhibición de la señalización de Akt y la activación de proteínas apoptóticas. La partenólida suprime la neovascularidad y el crecimiento tumoral en xenotransplante de glioblastoma (Nakabayashi y Shimishu., 2012).

Recientemente, se ha mostrado que la combinación de la partenólida e inhibidores de la vía PI3K/mTOR (la cual juega un papel fundamental en el metabolismo del cáncer, bien contribuyendo a la progresión del ciclo celular, bien disminuyendo la apoptosis e incrementando las capacidades metastásicas de las células cancerígenas) tienen acción sinérgica para erradicar, tanto el tamaño y las poblaciones de células madre de leucemia mieloide aguda (LMA). Así mismo, la

combinación de la partenólida con radiación ionizante reduce la viabilidad tanto de poblaciones de células de osteosarcoma como de subpoblaciones de células madre de cáncer en LMA (Czyz *et al.*, 2013).

La partenólida es efectiva, sola o en combinación con docetaxel, para reducir la formación de colonias de células MDA-MB-231 y células HBL-100 de cáncer de seno, induciendo apoptosis y reduciendo la expresión de genes IL-8 prometastáticos y los genes GADD45b1 antiapoptóticos *in vitro*. Por otro lado, un tratamiento en animales tratados con la combinación de partenólida y docetaxel mostraron una ayuda significativa en la supervivencia comparada con animales no tratados o animales tratados con solo alguna de las dos drogas (Sweeney *et al.*, 2005).

#### **1.4 Cultivo de tejidos vegetales con fines de fitofarmacología**

La investigación dirigida a la búsqueda de nuevas sustancias químicas derivadas de plantas debe tener como prioridad en el presente y en el futuro sus esfuerzos dirigidos a una conservación sustentable y racional del uso de la biodiversidad. El cultivo de tejidos vegetales (CTV), también conocido como cultivo *in vitro*, consiste esencialmente en aislar asépticamente una porción de la planta (explante) para crecer protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones o plántulas mediante la provisión apropiada de medio nutricional adicionado con reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y condiciones ambientales (por ejemplo temperatura y luz) controladas (Staba, 1985; Barba *et al.*, 2001; Pierik, 1990). En consecuencia, el CTV tiene un papel esencial en la exploración de tecnologías alternativas de producción de

compuestos medicinales deseables a partir de plantas las cuales permiten hacer un uso racional de los recursos naturales vegetales (Karuppusamy, 2009).

Existen una serie de ventajas al producir metabolitos secundarios bioactivos por cultivo *in vitro* comparado con la que ocurre *in vivo*. Estas incluyen: a) la producción puede ser más segura, simple y más predecible, b) el aislamiento del compuesto bioactivo puede ser rápido y efectivo, comparado con la extracción en plantas complejas, c) los compuestos producidos *in vitro* pueden ser los mismos compuestos producidos en las plantas, d) los compuestos no deseados que se producen en las plantas cultivadas en el campo se pueden evitar en cultivos de tejidos, e) los cultivos de células y tejidos pueden producir una fuente de fitoquímicos estándar definidos en grandes volúmenes, f) los cultivos de células y tejidos son un modelo potencial para pruebas de elicitación (Karuppusamy, 2009). Debido a la importancia de la partenólida, es importante tener una fuente de producción sustentable y sostenible de partenólida, sin afectar al recurso vegetal y así poderlo mantener en su hábitat sin que corra el riesgo de amenaza o peligro de extinción por su uso medicinal, tal es el caso del cultivo de tejidos vegetales que representa una estrategia biotecnológica capaz de ser escalado a nivel biorreactor para la obtención de partenólida, la cual ha sido aceptada para su uso en la industria farmacéutica.

### **1.5 Líneas celulares de cáncer**

Por definición, una línea celular de cáncer se ha establecido cuando se ha vuelto inmortal, es decir, que se puede subcultivar un número indefinido de veces

generalmente sin perder sus características morfológicas y genéticas. Sin embargo, las líneas celulares establecidas no tumorígenas siguen teniendo control del crecimiento y muestran una serie de rasgos típicos, entre los que suelen figurar los siguientes:

- Dependencia de anclaje: hace falta una superficie firme a la que las células puedan adherirse.
- Dependencia de suero: necesitan factores de crecimiento esenciales presentes en el suero. Por el contrario, las células tumorales pueden crecer con concentraciones de suero muy bajas.
- Inhibición por densidad: las células sólo crecen hasta alcanzar una determinada densidad; por tanto, el crecimiento está limitado, quizás por medio de mecanismo relacionados con los contactos entre células.

Estas propiedades sirven de parámetros de referencia para determinar la normalidad o funcionalidad de una célula cancerígena, útiles en ensayos de citotoxicidad. Por supuesto, las líneas celulares establecidas sólo son una aproximación a la situación *in vivo*. A diferencia de las células cultivadas a partir de tejidos normales, las células cultivadas a partir de tumores muestran cambios en todas o en alguna de estas propiedades, se dice que han sido transformadas (Lewin, 1994).

### **1.5.1 Ensayos de citotoxicidad *in vitro***

La configuración de los modelos experimentales empleados *in vitro* para valorar la toxicidad de compuestos químicos se fundamenta en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato biológico es el material, generalmente orgánico o vivo, sobre el que se aplica *in vitro* el xenobiótico, y cuyas reacciones ante tal estímulo se quieren extrapolar al ser humano. Estas alteraciones se valoran mediante los denominados indicadores de toxicidad, que son los parámetros que se determinan para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo. El valor predictivo del modelo experimental *in vitro* dependerá de la buena conjunción entre su sustrato biológico y los indicadores de toxicidad aplicados, aunque también presentan gran trascendencia el protocolo utilizado para la exposición al tóxico y el procedimiento empleado para evaluar la significación estadística de los resultados (Repetto, 1995).

## 2 JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad mundial por lo que es necesario contar con nuevos agentes quimioterapéuticos, ya que uno de los factores limitantes en los tratamientos utilizados para tratar el cáncer es la toxicidad o daño que se le hace a tejidos normales. Las plantas son una fuente de principios bioactivos para la elaboración de fármacos, que podrían ser aprovechados para su uso clínico en cáncer, como una opción de tratamiento. La fitofarmacología explota la capacidad que poseen algunas plantas de producir principios bioactivos, por lo que la búsqueda de nuevas especies con actividad antitumoral es una posibilidad real, en donde el cultivo de tejidos vegetales juega un papel importante para lograr una producción controlada y sustentable. La especie *T. parthenium* produce partenólida, una lactona sesquiterpénica a la que se le atribuyen propiedades contra el cáncer por lo que la evaluación de la acción citotóxica de los extractos obtenidos de raíces cultivadas *in vitro* de *T. parthenium* servirá para avanzar en la búsqueda de principios activos citotóxicos, a través de bioensayos con diferentes líneas celulares de cáncer.



### **3 HIPÓTESIS**

El extracto metanólico obtenido de la biomasa de los cultivos *in vitro* de raíces de *Tanacetum parthenium*, al contener a la partenólida, tendrá acción citotóxica en líneas celulares de cáncer.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la citotoxicidad del extracto metanólico de las raíces cultivadas *in vitro* de *T. parthenium* en líneas celulares de insulinoma y hepatoblastoma.

### **4.2 Objetivos particulares**

Establecer el cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium*.

Cuantificar el contenido de la partenólida y de compuestos fenólicos en los cultivos de raíces en suspensión.

Evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico de las raíces sobre las líneas celulares de cáncer.

## **5 MATERIAL Y MÉTODO**

### **5.1 Material vegetal**

Se utilizaron explantes foliares de plantas de *T. parthenium* colectadas en Apaxco, Estado de México, para la obtención de cultivos *in vitro* de raíces. Un ejemplar de la planta se identificó en el Herbario Metropolitano de la UAM-Iztapalapa al cual se le asignó el número de registro: UAMIZ 78435.

#### **5.1.1 Establecimiento del cultivo aséptico**

En un vaso de precipitados se colocaron hojas de *T. parthenium*, se lavaron con agua corriente de la llave por 15 min con detergente. Posteriormente, los explantes se enjuagaron 3 veces con agua destilada, se introdujeron en una solución de etanol al 70% por 1 min, seguido de su inmersión en una solución de NaClO al 1.8% (se adicionaron 3 gotas de tween/100mL de solución preparada) por 15 min. Finalmente, los explantes fueron lavados (4 veces) con agua estéril en una campana de flujo laminar. Las hojas fueron seccionadas en una caja Petri con solución antioxidante (compuesta de 150 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico) y se cultivaron en medio de cultivo MS al 50% sin reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Los cultivos fueron incubados por una semana, tiempo en el que se monitoreó la contaminación. Los explantes que no presentaron contaminación se transfirieron a medios de cultivo para inducción de raíces.

### **5.1.2 Inducción de raíces**

El medio de cultivo consistió de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 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 de ácido naftalenacético (ANA). 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 6 g se propagó en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 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 ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### **5.1.3 Proliferación del cultivo de raíces y cinética de crecimiento**

Se realizaron 3 cinéticas de crecimiento por triplicado (3 lotes de 57 matraces cada uno), tomando muestras cada 48 h durante 38 días. Se subcultivaron las raíces cada 32 días para la generación de la biomasa que fue usada para preparar los extractos.

### **5.2 Extracción**

Las raíces se secaron en una estufa durante 2 días a 60°C, después se trituraron en un mortero; posteriormente se tomaron 8.3 g, se les adicionó 468 mL de metanol y se sometieron a reflujo durante 30 min a 60°C. Los extractos obtenidos con metanol se evaporaron hasta sequedad con presión reducida en un rotavapor. Una muestra representativa del extracto fue empleada para el análisis cuantitativo de la

partenólida y de compuestos fenólicos. Estos se conservaron en un frasco ámbar en refrigeración a 4°C.

### **5.2.1 Cuantificación de la partenólida y de compuestos fenólicos**

Se estimó el contenido de fenoles totales en todos los extractos derivados de las cinéticas de crecimiento. Se empleó el método de Folin-Ciocalteu, donde el ácido gálico fue el compuesto de referencia; los resultados fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa extraída (mg EAG/g). Aquel extracto presentando mayor contenido de fenoles totales fue seleccionado para su análisis de partenólida y algunos compuestos fenólicos por HPLC. La producción de metabolitos secundarios, como partenólida y fenoles, puede ser potenciada por condiciones de estrés. También se consideró el crecimiento alcanzado por las raíces para tener la cantidad suficiente de biomasa para preparar los extractos a utilizar en bioensayos de citotoxicidad.

Se detectó partenólida y los compuestos fenólicos: verbascósido, ácido p-coumárico, ácido cafeíco, ácido salicílico y ácido clorogénico por HPLC. Por tanto, se preparó una solución stock de 10 mL de metanol con 10 mg de la partenólida (Sigma-Aldrich Co, 97% de pureza). Se realizó la curva de calibración con la solución stock a partir de alícuotas equivalentes de 20 a 250 µg/mL de la partenólida, las cuales se inyectaron por separado en la columna (Kromasil® 100-5 C18 de 250 x 4.6 mm) instalada en el cromatógrafo de alta resolución Agilent 1100 series.

También se realizó la curva de calibración para cada compuesto fenólico con las soluciones stock a partir de alícuotas equivalentes de 16.36 a 180  $\mu\text{g/mL}$  de verbascósido (Extrasynthese, 99% de pureza), de 20-100  $\mu\text{g/mL}$  de ácido p-coumárico (Sigma-Aldrich Co, 98% de pureza), de 20 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de ácido cafeíco (Sigma-Aldrich Co, 98% de pureza), de 27.27 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de quercetina (Sigma-Aldrich Co, 95% de pureza), de 18.18 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de ácido salicílico (Sigma-Aldrich Co, 99% de pureza), de 36.36 a 100  $\mu\text{g/mL}$  de ácido clorogénico (Sigma-Aldrich Co, 95% de pureza) y como estándar interno de 21.8 a 200 de ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich Co, 96% de pureza), las cuales se inyectaron por separado. El equipo fue programado en gradiente acorde a la Tabla 1 con base a fase móvil consistiendo de ácido acético al 0.3%, agua y acetonitrilo (ACN), un flujo de 0.7 mL/min y una temperatura de 30°C, la detección de la señal fue de 214, 330 y 350 nm por medio del detector de arreglo de diodos (DAD). Cada muestra, incluyendo muestras de extractos metanólicos, se filtraron a través de un filtro de membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de la inyección en el HPLC (Agilent 1100 series). El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ .

Tabla 1. Gradiente programado en el equipo HPLC para la cuantificación de la partenólida y compuestos fenólicos.

TIEMPO (minutos)	Ác. Acético al 0.3%	% ACN	% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0.00	100.0	0.0	0.0
12.00	75.0	25.0	0.0
20.00	65.0	35.0	0.0
30.00	65.0	35.0	0.0
31.50	60.0	40.0	0.0
33.00	0.0	40.0	60.0
35.00	0.0	55.0	45.0
45.00	0.0	100.0	0.0

### 5.3 Cultivo de líneas celulares de cáncer

La línea RINm5F consiste de células tumorales productoras de insulina, provenientes de islotes pancreáticos tumorales (Tiedge, *et al.*, 1993); fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC). Se sembraron en medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 8 % de suero fetal de bovino, 1mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico y 50 µg/mL de gentamicina.

La línea HepG2 es una línea proveniente de un hepatoblastoma humano; fue adquirida de la ATCC. Las células HepG2 fueron mantenidas en medio Williams (Sigma-Aldrich, MO) suplementado con 8% de suero fetal de bovino y 50 µg/mL de gentamicina.

Para resembrarlas se utilizó tripsina-verseno 0.025% en PBS y se crecieron en botellas de cultivo; una vez establecido el cultivo se llevaron a cabo los bioensayos de citotoxicidad. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con una atmósfera controlada del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad a una temperatura de 37°C.

### **5.3.1 Pruebas de citotoxicidad:**

Se tuvo un control negativo (células sin tratamiento) y como control positivo la partenólida, y los tratamientos con el extracto, todos por triplicado.

#### Ensayo de reducción del MTT

Para determinar la funcionalidad celular se utilizó la prueba de MTT por el método de Mosmann (1983), que se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de la mitocondria para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) soluble en agua (amarillo), a formazán (azul) insoluble en agua. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos con 200,000 células/pozo con medio Williams completo y se dejaron crecer por 24 h a 37°C y 95% de humedad. Después se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y se les cambio el medio por uno sin suero fetal de bovino. Las células se trataron a) con el extracto metanólico de *T. parthenium* a distintas concentraciones de acuerdo al contenido de partenólida obtenido por HPLC (0, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100, 200 y 400 µM) y por separado, con b) el estándar de partenólida a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µM), durante 24 h. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y se les adicionó una solución de 0.1 mg/mL de MTT en PBS a pH



7.5. Se incubaron por 3 h a 37°C y 95 % de humedad. Al finalizar el tiempo de incubación se retiró el medio (color amarillo) de las células y se les agregó 0.5 mL de una solución de HCl 0.04 M en 2-isopropanol, durante 15 min, para disolver el formazán. El cambio de absorbancia se leyó a 596 nm en un lector de ELISA. La funcionalidad se determinó por el porcentaje con respecto al grupo control (Stockert *et al.*, 2012).

#### Rojo neutro (RN)

La prueba de citotoxicidad de rojo neutro (3-amino-7-dimetil-2-metilfenacina hidrocloreuro) se basa en la incorporación de colorante dentro del lisosoma de las células viables. Se sembraron 200,000 células/pozo en multicámaras de 24 pozos con DMEM completo y se dejaron crecer por 24 h. Después de ese tiempo, se lavaron las células con PBS y se les aplicó las diferentes concentraciones del extracto y estándar de partenólida (descritas en el bioensayo de MTT). Concluido el periodo de exposición, las células se lavaron con PBS, y se les adicionó el colorante RN (50µg/mL), por 3 h a 37°C. El colorante RN fue previamente incubado por 24 h a 37°C y centrifugado por 10 min a 2000 g en una centrifuga Beckman GS-15R, para remover los cristales precipitados. Posteriormente se les retiró el colorante y las células fueron lavadas rápidamente con una solución fijadora (CaCl<sub>2</sub> 1%, y formaldehído al 0.5%). Después se adicionaron 0.5 mL de una solución de ácido acético al 1% y etanol al 50% para extraer el colorante. El cambio de absorbancia se leyó a 540 nm en un lector de ELISA. La funcionalidad se determinó por el porcentaje del cambio de extinción del RN (Doyle, *et al.* 1994).

#### **5.4 Análisis estadístico**

Las diferencias significativas obtenidas en las medias derivadas de todos los tratamientos fueron determinadas usando ANOVA, seguida por una prueba de Tukey a través del software SPSS (IBM SPSS Statistics, versión 22). Valores de  $p < 0.001$  fueron considerados significativos. Los controles y tratamientos se evaluaron por triplicado para cada concentración y se realizaron tres repeticiones del ensayo.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Tratamientos con regulador del crecimiento vegetal (RCV).

Se indujo rizogénesis a partir de explantes foliares de *T. parthenium* como respuesta a los tratamientos con ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA) a tres concentraciones probadas: 1, 2 y 3 mg/L, siendo las concentraciones de 1 y 2 mg/L las que presentaron organogénesis indirecta, es decir, pasaron por un estado intermedio en el que se formó callo (masa amorfa de células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación), para después inducirse la diferenciación a raíces; en cambio, a la concentración de 3 mg/L se presentó organogénesis directa (Figura 4a). Se determinó que el incremento en la concentración de ANA potenció la formación de raíces, siendo la última concentración evaluada la de mayor porcentaje de inducción (Tabla 2), por lo que se decidió usar las raíces generadas a partir del tratamiento de 3 mg/L para el establecimiento del cultivo en suspensión (Figura 4b), su proliferación y así realizar su cinética de crecimiento.

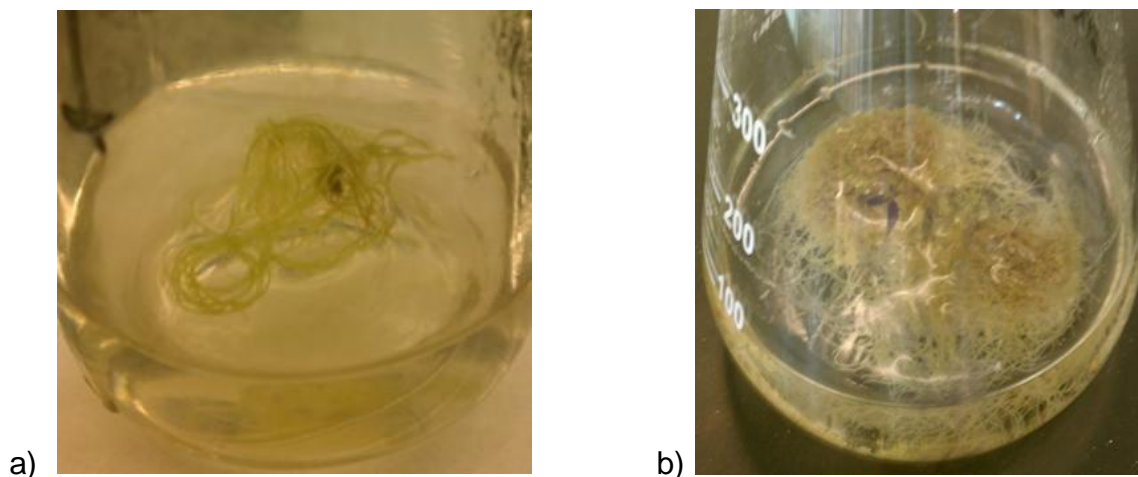


Figura 4: Cultivo de raíces obtenido con 3 mg/L de ANA a partir de explante foliar de *T. parthenium* después de 30 días de incubación a) medio solido; b) cultivo en suspensión.

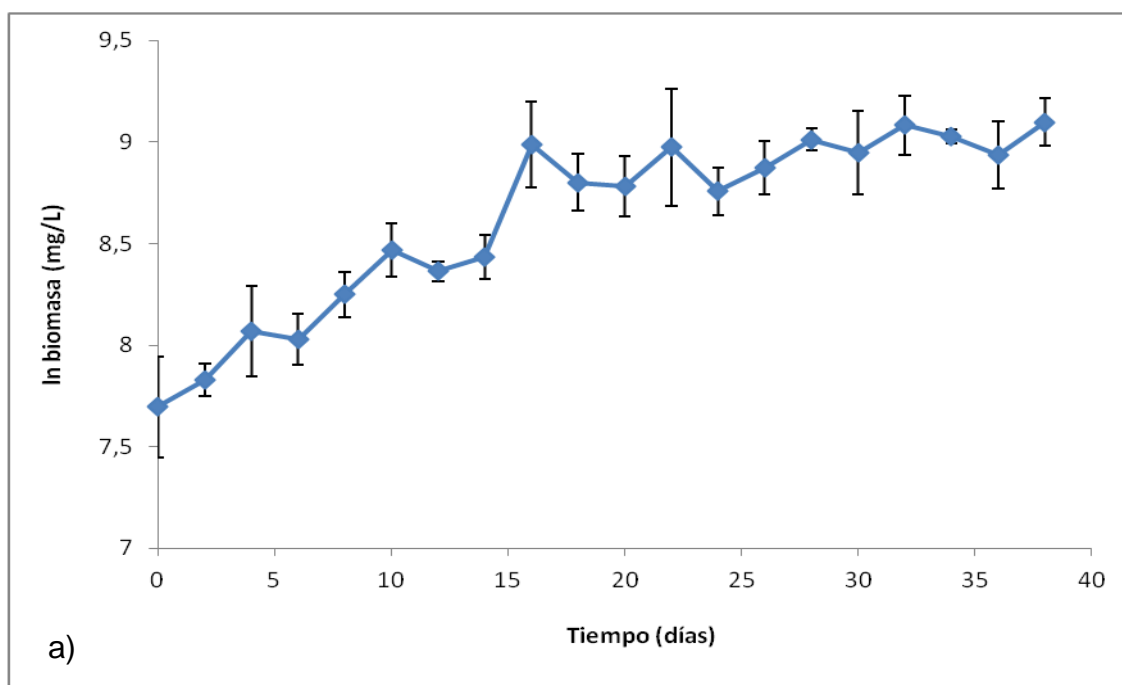
Tabla 2. Efecto del ácido naftalenacético (ANA) sobre la inducción de raíz en explantes foliares de *T. parthenium* después de 30 días de incubación.

ANA (mg/L)	Efecto en explante foliar	Porcentaje de inducción de raíz
0	Sin respuesta morfogénica	0% <sup>a</sup>
1	Formación de raíz vía organogénesis indirecta	21±3.5% <sup>b</sup>
2	Formación de raíz vía organogénesis indirecta	75.1±4.3% <sup>c</sup>
3	Formación de raíz vía organogénesis directa	89.2±5.2% <sup>d</sup>

## 6.2 Caracterización de la producción de biomasa: cinética del crecimiento.

La cinética del crecimiento se realizó durante 38 días, tiempo durante el cual se monitoreó su crecimiento, donde se observaron dos fases: la fase exponencial se da hasta el día 18, y la fase estacionaria del día 18 al día 38 (Figura 5a). Se obtuvo una cantidad máxima de 9 g/L de biomasa seca al término de la cinética, a partir de 2.73 g/L de inóculo inicial, lo cual corresponde a una productividad de 0.348 g/L por día, un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 10.1 días, una velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ) de  $0.069 \text{ d}^{-1}$ , que son datos importantes a tener en cuenta al momento de escalar el proceso.

El consumo de glucosa como fuente de carbono no fue completo al término de los 38 días de monitoreo del crecimiento de las raíces, iniciándose con 40 g/L de glucosa y terminando con aproximadamente 12.5 g/L (Figura 5b).



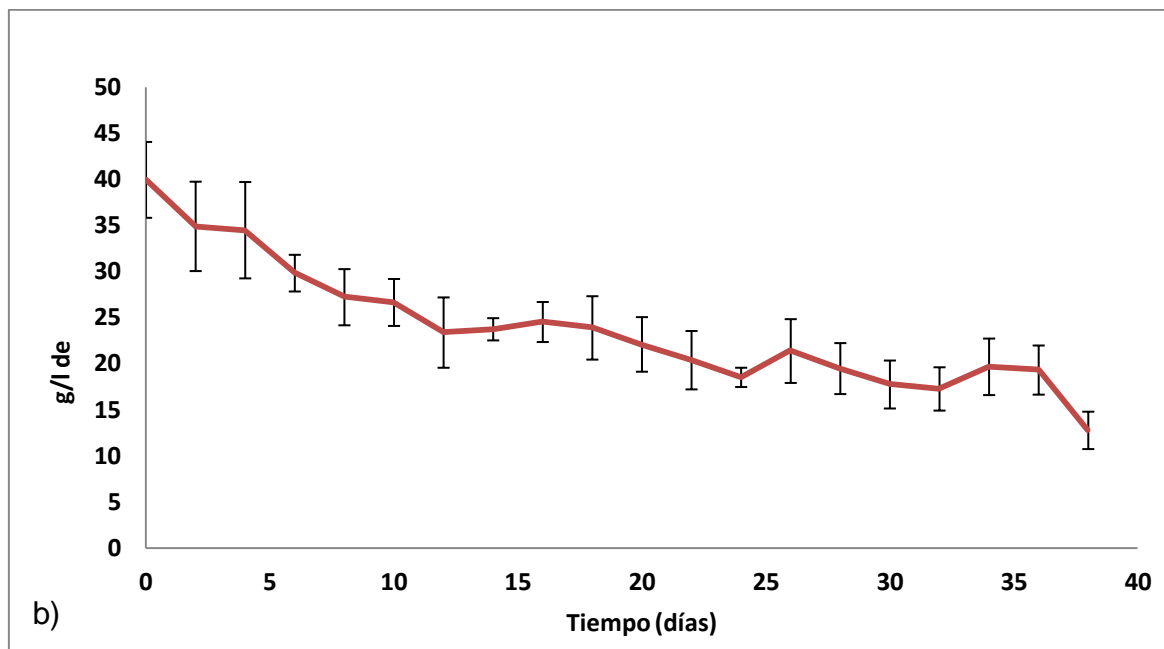


Figura 5. Cinética de crecimiento de cultivos de raíz en suspensión de *T. parthenium*.

a) Curva de crecimiento en base a escala logarítmica y b) consumo de glucosa del medio de cultivo.

### 6.3 Caracterización de la producción de fenoles totales

Se cuantificaron los compuestos fenólicos totales a lo largo de la cinética de crecimiento. Se encontró una mayor cantidad de fenoles al día 32 (Figura 6). Adicionalmente, en este día los cultivos se encontraban en fase estacionaria lo que permitió obtener una cantidad significativa de biomasa.

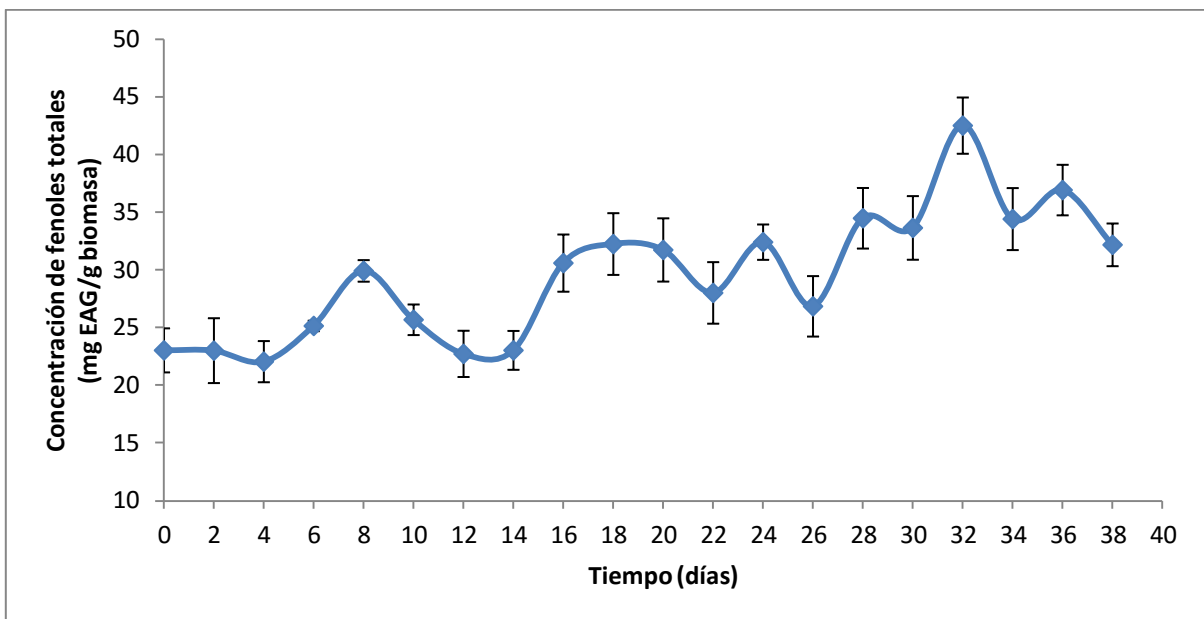
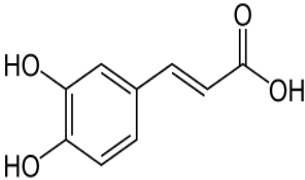
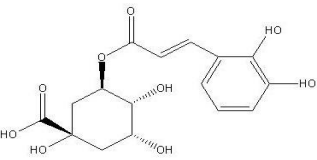
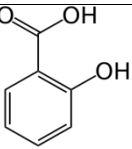
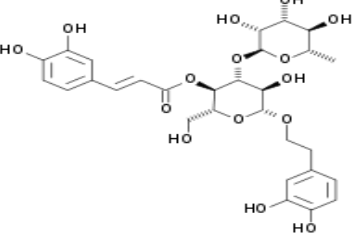
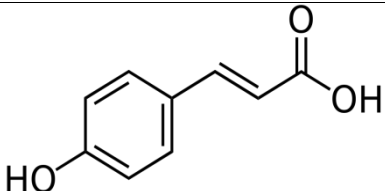


Figura 6. Producción de fenoles totales en el cultivo de raíz en suspensión de *T. parthenium* a lo largo de 38 días de incubación.

#### 6.4 Cuantificación de la partenólida y algunos fenoles por HPLC

La concentración de la partenólida encontrada en los cultivos de raíces en suspensión al día 32 fue de 0.0292 mg/g de biomasa seca. Además, se identificaron algunos compuestos fenólicos que han sido reportados por poseer diversas actividades biológicas, incluyendo entre ellas la citotóxica (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos fenólicos identificados en las raíces de *T. parthenium* cultivadas *in vitro* al día 32 y sus respectivas actividades biológicas (Dr. Duke's, Phytochemical and Ethnobotanical Database).

Compuesto y concentración	Estructura	Principales actividades biológicas
Ácido cafeíco 0.8529 mg/g		Citotóxico (IC <sub>50</sub> =200 µg/mL), anti VIH, fungicida, analgésico, antibacteriano, hepatoprotector, antiinflamatorio.
Ácido clorogénico 1.3448 mg/g		Anticancerígeno (colon, estómago, hígado y piel), hepatoprotector, inmunoestimulante, antioxidante, antihistamínico, antiinflamatorio.
Ácido salicílico 0.1905 mg/g		Antitumoral, analgésico, antibacteriano, antiinflamatorio, antioxidante, antiséptico, quimiopreventivo.
Verbascósido 0.0587 mg/g		Citotóxico (ED <sub>50</sub> =2.6 µg/mL), analgésico, antibacteriano, antihipertensivo, antiinflamatorio, antioxidante, antiséptico.
Ácido p-cumárico 1.8638 mg/g		Antileucémico (IC <sub>50</sub> 25-26 µg/mL), citotóxico, antibacteriano, antioxidante, antiséptico, antiespasmódico, quimiopreventivo, antiperoxidante.



## **6.5 Rendimiento de extracción**

Para preparar el extracto se usaron 8.34 g de biomasa seca obtenida al día 32 a partir de 6 matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 200 mL de medio de cultivo. Se obtuvieron 2.7 g de extracto semisólido de color café oscuro, dando un rendimiento del 32.37%.

## **6.6 Viabilidad celular**

Se realizó el ensayo de MTT y de RN para determinar la funcionalidad mitocondrial y lisosomal, respectivamente, en la línea celular de hepatoblastoma (HepG2) e insulinomas (RINm5F) identificando que las concentraciones tanto de partenólida como del extracto que disminuyeron la viabilidad celular. En el caso de la línea HepG2 con la partenólida mediante el ensayo de MTT se observó una disminución de la viabilidad celular a las concentraciones de 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$ , donde se presentan diferencias significativas con respecto al control, mientras que en el extracto conteniendo las mismas concentraciones de partenólida no existió una disminución de la viabilidad celular (Figura 7 y 8).

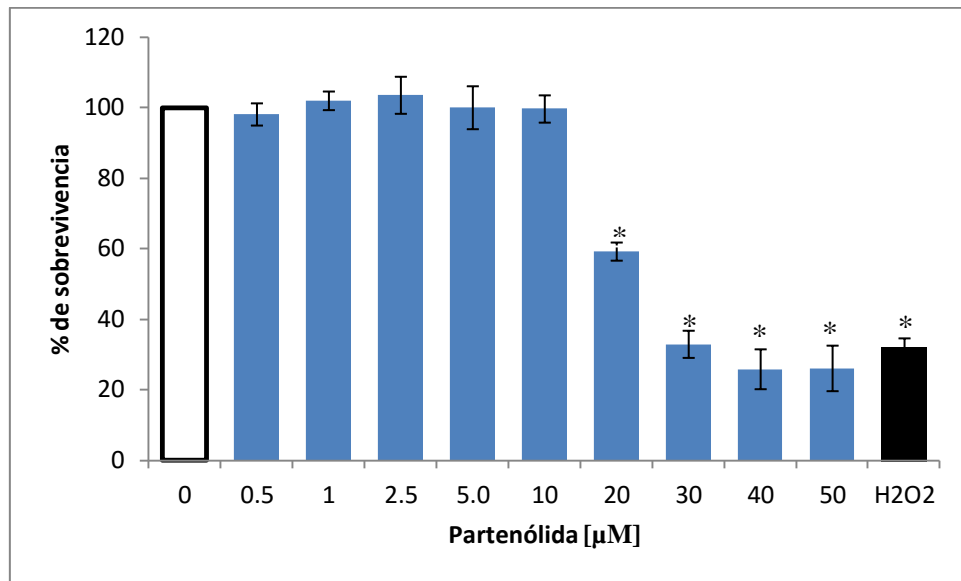


Figura 7. Efecto de la partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) de la línea HepG2 a 24 h del tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  DEM.

\*Diferencia significativa con respecto al control  $p < 0.001$  (ANOVA).

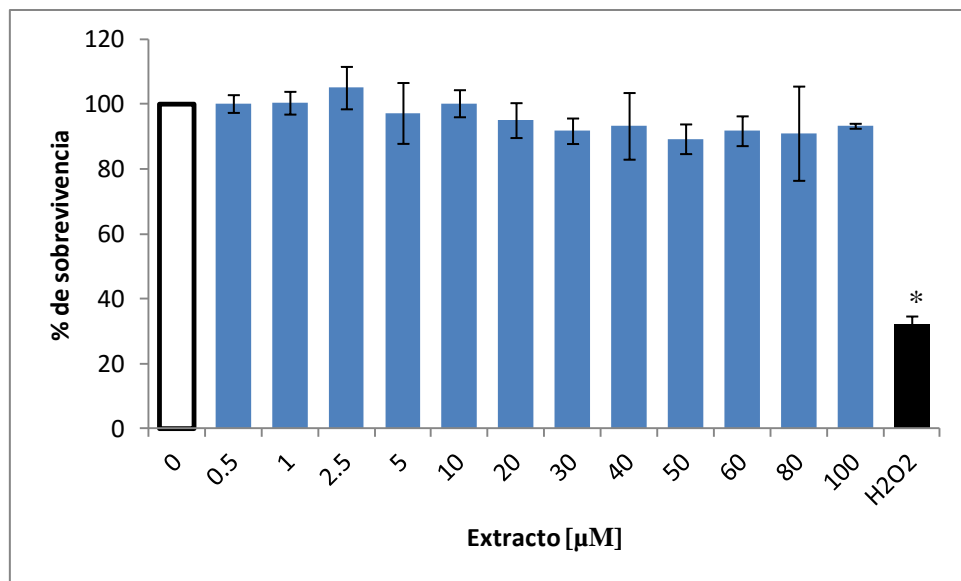


Figura 8. Efecto del extracto metanólico de *T. parthenium* a distintas concentraciones según su contenido de partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT)

de la línea HepG2 a 24 h de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  DEM.

\*Diferencia significativa con respecto al control  $p < 0.001$  (ANOVA).

En el caso de la línea RINm5F para el ensayo de MTT con la partenólida también hubo disminución de la viabilidad celular siendo las concentraciones de 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  las que presentan diferencias significativas respecto al control y para el caso del extracto no existe disminución de la viabilidad celular (Figura 9 y 10).

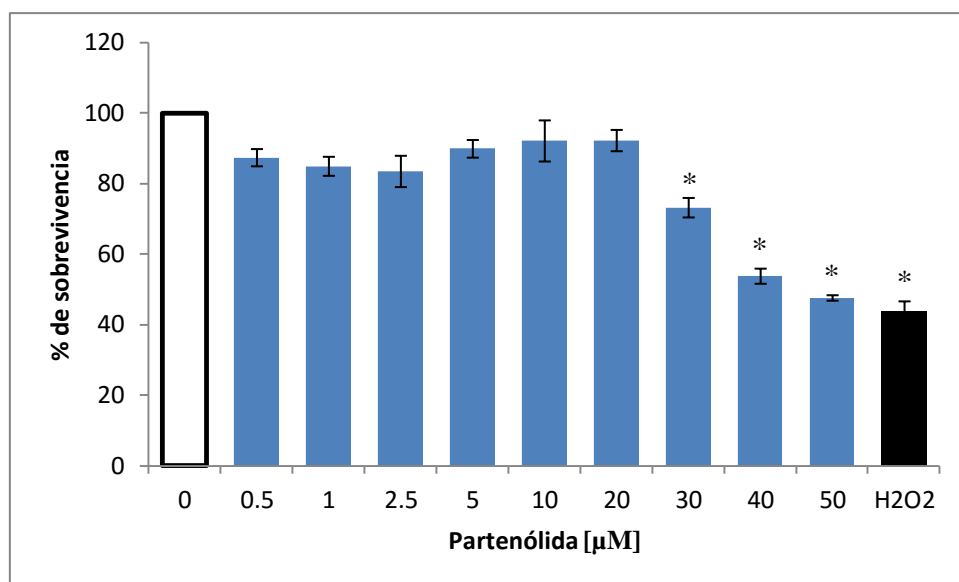


Figura 9. Efecto de la partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  DEM.

\*Diferencia significativa con respecto al control  $p < 0.001$  (ANOVA).

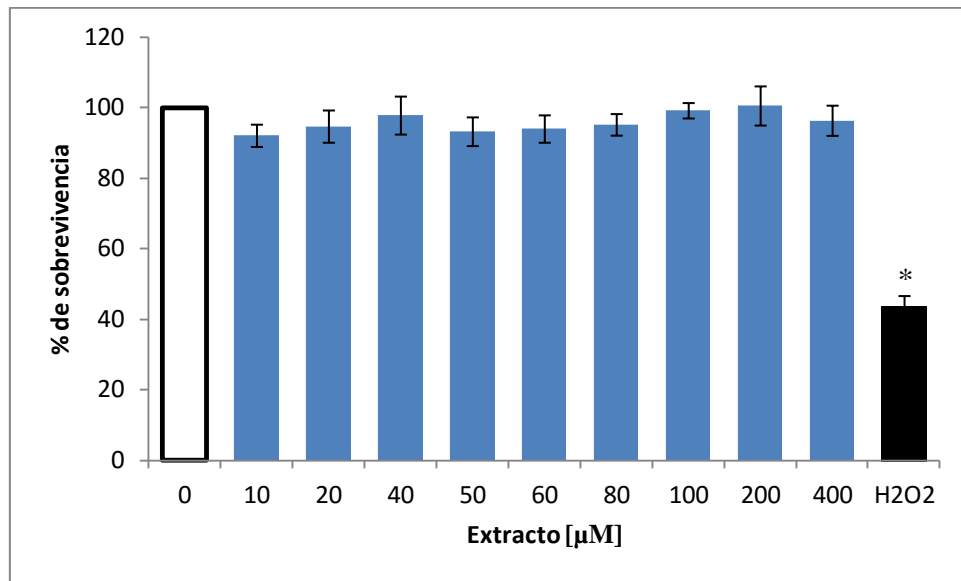


Figura 10. Efecto del extracto metanólico de *T. parthenium* a distintas concentraciones según su contenido de partenólida sobre la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  DEM. \*Diferencia significativa con respecto al control  $p < 0.001$  (ANOVA).

Con respecto al ensayo de RN, para la línea celular RINm5F, en el caso de la partenólida existe diferencia significativa a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  y con el extracto no hay diferencias significativas (Fig. 11 y 12).

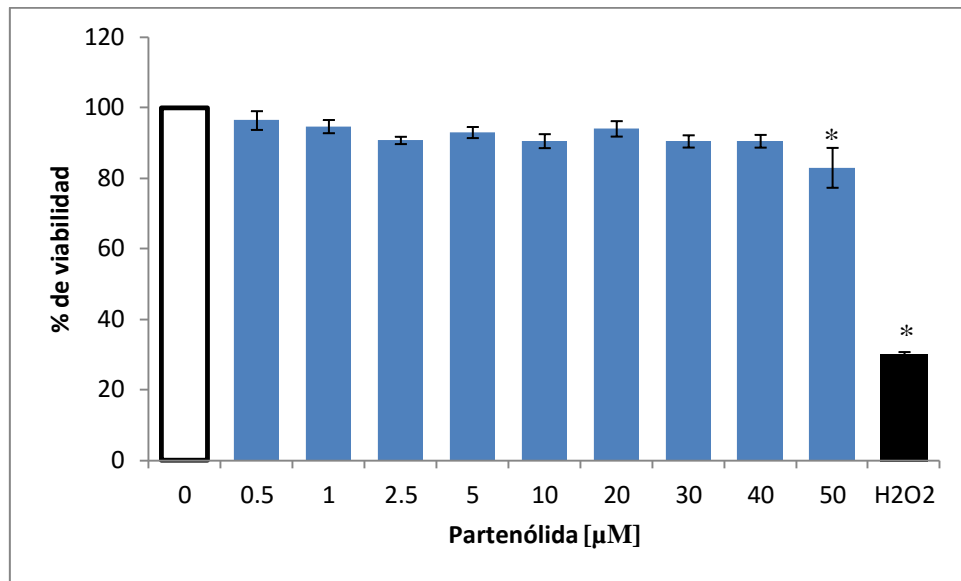


Figura 11. Efecto de la partenólida sobre la funcionalidad de los lisosomas (ensayo de RN) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  DEM. \*Diferencia significativa con respecto al control  $p < 0.001$  (ANOVA).

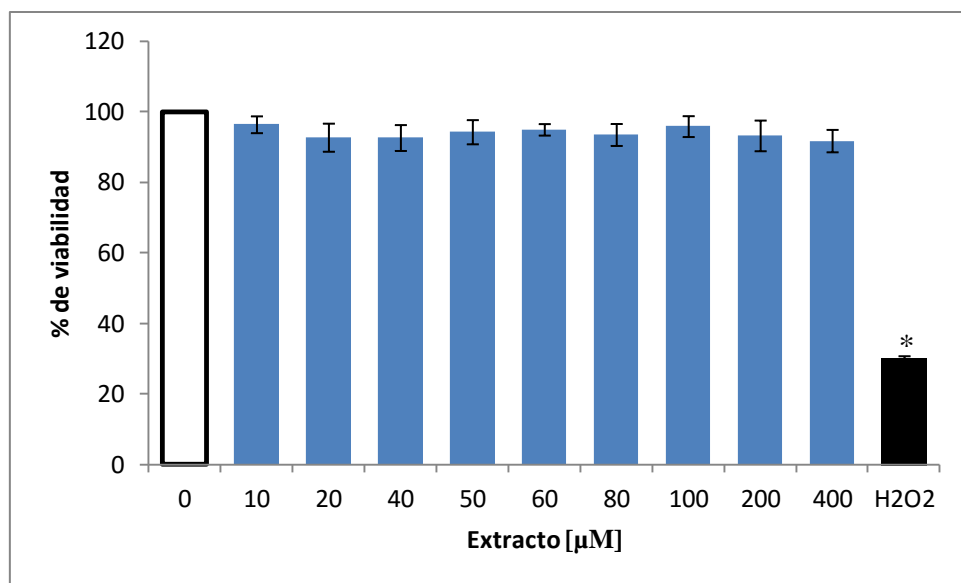


Figura 12. Efecto del extracto metanólico de *T. parthenium* a distintas concentraciones según su contenido de partenólida sobre la funcionalidad de los

lisosomas (ensayo de RN) de la línea RINm5F a 24 h de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  DEM. \*Diferencia significativa con respecto al control  $p < 0.001$  (ANOVA).

## 7 DISCUSIÓN

La partenólida es una lactona sesquiterpénica de interés farmacológico por su potencial uso terapéutico debido a su actividad antiinflamatoria, antiprotozoaria, leishmanicida, antioxidante y anticancerígena (Cijo George *et al.*, 2012). La partenólida aislada de *T. parthenium* ha sido extensamente estudiada en relación a sus propiedades anticancerígenas (Wyrębska *et al.*, 2013). Debido a la importancia de la partenólida se han establecido cultivos *in vitro* con la finalidad de producirla en un sistema controlado, ofreciendo así una producción sustentable y sostenible (Brown *et al.*, 1996; Stojakowska-Kisiel 1997; Rateb *et al.*, 2007), conservando el recurso vegetal en su hábitat y evitando de esta manera que pueda ser una especie amenazada o en peligro de extinción por su uso medicinal, de ahí la necesidad de proponer opciones de cultivo *in vitro* de *T. parthenium* y realizar bioensayos con líneas celulares de cáncer.

Se obtuvieron cultivos de raíces en suspensión a partir de explantes foliares de *T. parthenium* en medio MS al 50% con 40 g/L de glucosa y 3 g/L de ANA, libres de patógenos para la producción de la partenólida. La concentración de la partenólida se cuantificó en las raíces para determinar el rendimiento con base en la cantidad de la partenólida por gramos de biomasa seca y llevar a cabo los bioensayos con las líneas celulares de cáncer.

La cantidad máxima de biomasa seca obtenida del cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium* a los 38 días fue de 9 g/L, mayor a la alcanzada en un cultivo de

raíces transformadas en suspensión de *Solanum eleagnifolium* Cav, que fue de 4 g/L a los 30 días (Talou *et al.*, 1994). El  $t_d$  para el cultivo de raíz de *T. parthenium* fue de 10.05 días y la  $\mu_m$  fue de  $0.0639\text{ d}^{-1}$ , mientras que para *S. eleagnifolium* Cav el  $t_d$  fue de 4.68 días y la  $\mu_m$  fue de  $0.14\text{ d}^{-1}$ . Esto significa que el crecimiento de las raíces de *T. parthenium* es más lento, posiblemente debido a que las raíces de *S. eleagnifolium* eran transformadas. A pesar de haber sido usada la misma cantidad de inóculo, para la cinética de *S. eleagnifolium* Cav se usaron matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo, el doble de volumen que el usado en la cinética de este trabajo, lo cual pudo haber sido una ventaja para las raíces de *S. eleagnifolium* Cav en cuanto a la velocidad de crecimiento.

La elección de la fuente de carbono de glucosa fue dada por los antecedentes, en donde se ha comparado el efecto de diferentes sustratos y diferentes concentraciones (sacarosa, glucosa, fructosa y almidón) en brotes, siendo la glucosa la que promueve la mayor producción de la partenólida (Rateb *et al.*, 2007). El consumo de glucosa en el medio de cultivo no fue total, de manera que el crecimiento de las raíces podría continuar por más días de los monitoreados, aunque lo conveniente sería optimizar el consumo de la fuente de carbono, por lo que se tendrían que buscar las condiciones de mayor consumo por parte de las raíces, siendo la transformación por *Agrobacterium rhizogenes* una posible opción, de manera que se acelere su crecimiento, ahorrando así tiempo para su cosecha, mejorando el rendimiento y maximizando el consumo de los nutrientes del medio de cultivo.



En un estudio en invernadero realizado para la identificación de la partenólida en diferentes órganos de *T. parthenium* a un mes de crecimiento se encontró una mayor concentración en flores (~5.5 mg/g), seguido de hojas (~1 mg/g) y la menor concentración en tallos (<1 mg/g), pero no se encontró a la partenólida en las raíces (Majdi *et al.*, 2011). Mientras que en las raíces crecidas a 32 días para este estudio si se encontró a la partenólida a una concentración de 0.0292 mg/g de biomasa, que es una cantidad baja comparada con las flores, aunque es una característica limitante si se trata de producir a la partenólida debido a que eso implicaría la necesidad de cultivar grandes cantidades de plantas y esperar a la floración, que no sería homogénea en todas las plantas y que tiene concentraciones variables dependiendo del estado de floración, por lo que se propondría realizar transformación o realizar ingeniería genética en el cultivo de raíces para promover una mayor producción de la partenólida, así como realizar pruebas de elicitación para poder tener un rendimiento que se aproxime en lo posible al rendimiento obtenido en flores.

También se realizó una prueba para determinar los compuestos fenólicos totales ya que son compuestos que también han mostrado actividad citotóxica y son de relevancia por su potencial en la promoción de la salud y prevención de enfermedades, así como por la seguridad de su uso y aceptación por los consumidores (Kratchanova *et al.*, 2010). Al realizar la cuantificación de la partenólida por HPLC también se cuantificaron compuestos fenólicos, tales como el ácido cafeíco (0.8529 mg/g) ácido p-cumárico (1.8638 mg/g), ácido clorogénico (1.3448 mg/g), verbascósido (0.0587 mg/g) y ácido salicílico (0.1905 mg/g), los

cuales se encuentran en mayor concentración comparado con un cultivo de raíces de la especie *Lactuca Virosa* a cuatro semanas de cultivo en donde encontraron 0.044 mg/g de ácido cafeíco, 0.104 mg/g de ácido p-cumárico y 1.127 mg/g de ácido clorogénico (Stojakowska *et al.*, 2012).

Así las raíces de *T. parthenium* podrían ser una buena fuente de compuestos fenólicos que puedan ser usados en diferentes estudios de actividad biológica. Hasta el momento no hay reportes en la literatura de la producción del verbascósido en cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium*, por lo que así como este compuesto, se podrían estar sintetizando otros compuestos que no se encuentran presentes en una planta crecida de manera silvestre y que pudieran ser aprovechados para su uso medicinal.

Por otro lado, en el ensayo de MTT y de RN se encontró que existe una inhibición de la viabilidad celular en una manera dependiente de la concentración del estándar de partenólida, por lo que en las mayores concentraciones probadas para las líneas HepG2 y RINm5F hubo una disminución en la funcionalidad celular con diferencias significativas con respecto del control, pero no con el extracto. Al respecto cabe mencionar que se sabe que las plantas medicinales contienen, normalmente, más de una sustancia activa y diversas sustancias inactivas que influyen en la acción de los compuestos activos (Sharapin, 2000), siendo los compuestos fenólicos los que probablemente influyeron negativamente en la actividad citotóxica de la partenólida al contrarrestar el estrés oxidante generado por la partenólida en el mecanismo de acción que implica daño en las enzimas antioxidantes; de manera que habría que

realizar un fraccionamiento del extracto para tener sólo a las lactonas sesquiterpénicas y evitar así los compuestos interferentes de la actividad citotóxica de la partenólida en inclusive de otras lactonas sesquiterpénicas producidas en el cultivo de raíces de *T. parthenium*.

En un estudio realizado con la partenólida en la línea HepG2 a 48 horas usando también el ensayo de MTT, se encontró una inhibición de la funcionalidad celular en una manera dependiente de la concentración, aunque con los datos obtenidos tanto en este trabajo como en el estudio de 48 horas, se sugiere que no sólo depende la actividad citotóxica de la concentración, sino también del tiempo de exposición con la partenólida ya que mientras la  $IC_{50}$  determinada en este estudio a 24 horas es de aproximadamente 20  $\mu$ M, a 48 horas es de 9  $\mu$ M (Sun *et al.*, 2014); en otro estudio a 72 horas mediante el ensayo de azul de tripano, la  $IC_{50}$  fue de 6 a 7  $\mu$ M (Ralstin *et al.*, 2006) lo cual confirma el potencial citotóxico de la partenólida para esta línea celular.

Hasta ahora no hay reportes del estudio de la partenólida en la línea celular de insulinoma RINm5F, de manera que este trabajo abre las puertas a nuevos estudios con esta línea celular y con otros modelos de estudio de insulinoma usando la partenólida. En la línea celular habría que probar otros tiempos de exposición para conocer si el efecto depende no sólo de la dosis, sino también del tiempo de exposición, así como elucidar los mecanismos de acción de la partenólida en esta línea celular.

## 8 CONCLUSIONES

El medio de cultivo (MS) adicionado con ANA (1-3 mg/L) promueve la inducción de raíces vía organogénesis directa e indirecta, siendo la concentración de 3 mg/L la que promovió inducción de raíces vía organogénesis directa en un 89.2%.

La mayor producción de biomasa seca fue de 9 g/L a los 38 días, tiempo que duró la cinética de crecimiento.

Se encontró partenólida en el extracto del material cultivado *in vitro* a una concentración de 0.0292 mg/g de raíz seca a los 32 días de cultivo.

Las concentraciones de la partenólida que redujeron significativamente la viabilidad celular de la línea HepG2 fueron de 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  en un 59, 32, 25 y 26%, respectivamente, con el ensayo de MTT. Para la línea celular RINm5F fueron las concentraciones de 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  en un 73, 53 y 47%, respectivamente, con el ensayo de MTT y de 50  $\mu\text{M}$  en un 82% con el ensayo de RN.

## 9 PERSPECTIVAS

Realizar pruebas de elicitación y transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*, en los cultivos de raíz de *T. parthenium*, para potenciar la producción de la partenólida y aumentar la velocidad de crecimiento de las raíces.

Fraccionar el extracto para obtener tanto a las lactonas sesquiterpénicas (conteniendo a la partenólida) y a los fenoles, evitando así a los compuestos que puedan estar interfiriendo en cuanto a sus actividades biológicas, para seleccionar la fracción que tenga la mayor actividad citotóxica.

Caracterizar a la fracción con más actividad citotóxica para tener una fracción estandarizada del extracto metanólico.

Hacer bioensayos de la fracción con la mayor actividad citotóxica en las líneas celulares, combinado con agentes usados en quimioterapia para determinar si existe algún efecto sinérgico o acumulativo que pudiera potenciar el efecto.

## 10 BIBLIOGRAFÍA

Bandi P, Barrera H, Graves K, Hargrove T, Maitin-Shepard M, Naishadham D, Shah M, Simard E, Simpson S, Sullivan K, Trapido E & Wagner D. 2012. Datos y estadísticas sobre el cáncer entre los hispanos/latinos 2012-2014. American cancer society. Atlanta, Georgia. pp 2-3.

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

Barba A, Luna B, Romero J. 2001. Micropropagación de plantas. Trillas, México, D.F.

Bertram JS. 2000. The molecular biology of cáncer. *Molecular Aspects of Medicine* 21(6): 167-223.

Brown AMG, Lowe KC, Davey MR & Power JB. 1996. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): tissue culture and parthenolide synthesis. *Plant Science* 116: 223-232.

Cijo VG, Naveen Kumar DR, Suresh PK & Ashok Kumar R. 2012. A review on the therapeutic potentials of parthenolide: a sesquiterpene lactone. *International Research Journal of Pharmacy* 3: 69-73.

Cordero C CP & Aristizeibal G FA. 2002 Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4:100-106.

Czyz M, Koprowska K & Sztyler-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.

Doyle A, Griffiths JS & Newell DG. 1994. *Cell & Tissue, Culture: Laboratory & Procedures*. Ed. John Wiley & Sons, New York, 4B:7.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M & Boyle P. 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 18: 581–592.

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* 3:1222-1239.

Kemper KJ. 1999. Feverfew (*Tanacetum parthenium*). The Longwood Herbal Task Force. p 3.

Kim SL, Thi Kieu TT, Jeon BJ, Kim SH, Kim IH, Lee SO, Lee ST & Kim SW. 2012. Synergistic effect of parthenolide in combination with 5-Fluorouracil in SW480 cells. *Intestinal Research* 10:357-364.

Kratchanova M, Denev P, Ciz M, Lojek A & Mihailov A. 2010. Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica* 57:229–234.

Lewin B. 1994. *Genes*. Editorial Reverté. Barcelona, España. Pp 1049-1050.

Majdi M, Liu Q, Karimzadeh G, Malboobi MA, Beekwilder J, Cankar K, de Vos R, Todorovic´ S, Ana Simonovic´ & Bouwmeester H. 2011. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry* 72:1739–1750.

Marcano D & Hasegawa M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Editorial Torino. Caracas, Venezuela. pp 29-30.

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.

Monguelli, E & Pomilio A. 2002. Nuevos medicamentos y etnomedicina, Del uso popular a la industria farmacéutica. *Ciencia Hoy* 12 (68): 1-8.

Mosmamm T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods*. 65:55-63.

Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.

Muñoz A. 1997. *Cáncer: genes y nuevas terapias*. Editorial Elipse. Madrid, España. p 13.



Nakabayashi H & Shimizu K. 2012. Involvement of Akt/NF- $\kappa$ B pathway in antitumor effects of parthenolide on glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. Nakabayashi and Shimizu BMC Cancer 12:453.

Pareek A, Suthar M, Rathore GS & Bansal V. 2011. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L): A systematic review. Phcog Rev 5:103-10.

Pierik RLM. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa, España.

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 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> cell cycle arrest. Molecular Cancer Research 4:387-399.

Repetto M. 1995. Toxicología avanzada. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. p 46.

Riggins BR, Zwart A, Nehra R & Clarke R. 2005. The nuclear factor  $\kappa$ B inhibitor parthenolide restores ICI 182,780 (Faslodex; Fulvestrant)-induced apoptosis in antiestrogen-resistant breast cancer cells. Molecular Cancer Therapeutics 4(1): 1-9.

Ríos HM de los A & Hernández MM. 2001. Los genes supresores de tumores y el cáncer. Revista Cubana de Oncología 17(1):65-71.

Rosselli S, Bruno M, Raimondo FM, Spadaro V, Varol M, Koparal AT & Maggio A. 2012. Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. Siculum. Molecules 17: 8186-8195.

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.

Sánchez SV. 2001. Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 20(3):223-230.

Sepúlveda JK, Porta DH & Rocha SM. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología 21(003): 355-363.

Shafaghat A & Salimi F. 2008. Extraction and determining of chemical structure of flavonoids in *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip from Iran. J. Sci. I. A. U. 18 (68): 39-42.

Sharapin N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andres Bello. Volumen 78 de Ciencia y Tecnología.

Shioji Tiunan T, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, Prado Dias Filho B, Morgado-Díaz JA, de Souza W & Vataru Nakamura C. 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49:176-182.

Staba E. J. 1985. Plant tissue culture as a source of biochemicals. vol. 1, Plant tissue culture, vol. 2, Plant products, CRC Press, Florida, United States of America.

Stockert JC, Blazquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW & Villanueva A. 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazán product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 114:785-796.

Stojakowska A & Kisiel W. 1997. Production of parthenolide in organ cultures of feverfew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 159-162.

Stojakowska A, Malarz J, Szewczyk A & Kisiel W. 2012. Caffeic acid derivatives from a hairy root culture of *Lactuca virosa*. *Acta Physiol Plant* 34:291–298.

Sun J, Zhang C, Yong-Li B, Wu Y, Zhong-Liang C, Chun-Lei Y, Yan-Xin H, Sun Y, Li-Hua , Wang X, Yu-Xin L. 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, DJ Murry, 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.

Talou JR, Álvarez MA & Giuliatti AM. 1994. Cultivos de raíces transformadas: Producción de solasodina por *Solanum eleagnifolium Cav* y de tiofenos por *Tagetes laxa* Cabrera. *Dominguezia* 11:43-51.

Téllez N, de Castro C, Riveros T, Alvarado A, Mendoza L, Pedroso J & Torrenegra R. 2004. Citotoxicidad de metabolitos secundarios de algunas plantas colombianas. *Actualidad Biológica* 26: 12-16.

Tiedge M, Höhne M & Lenzen S. 1993. Insulin secretion, insulin content and glucose phosphorylation in RINm5F insulinoma cells after transfection with human GLUT2 glucose-transporter cDNA. *Biochemical Journal*. 15:113-8.

Vivanco I. y Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 489-501.

Wen J, You KR, Lee SY, Song CH & Kim DG. 2002. Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *The Journal of Biological Chemistry* 277:38954–38964.

Won YK, Ong CN, Shi X & Shen HM. 2004. Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis* 25:1449–1458.

Wyreńska 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.

Zhang S, Ong CN & Shen HM.2004. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 208:143–153.